

**Istituto Zooprofilattico Sperimentale
della Lombardia e dell'Emilia Romagna**

PRC 2016020

**Ruolo della fauna selvatica del mantenimento e diffusione
dell'antibiotico-resistenza**

Responsabile Scientifico: Dr. Tranquillo Vito

Data scadenza progetto: 14/11/2020

**Ricerca finanziata dal Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali
Dipartimento per la Sanità Pubblica Veterinaria, la Nutrizione e la Sicurezza degli Alimenti**



SINTESI

Introduzione

L'interesse per il ruolo della fauna selvatica nella diffusione e nel mantenimento dell'antibiotico-resistenza è aumentato nel corso degli ultimi 10 anni. La principale preoccupazione nasce dal timore che l'eventuale dimostrazione di un ruolo della fauna selvatica come "serbatoio" e "mantenimento" di batteri portatori di geni di resistenza, contribuendo alla contaminazione ambientale di batteri resistenti o materiale genetico di resistenza, possa compromettere gli sforzi messi in atto, soprattutto in questi ultimi anni, in campo medico e veterinario per ridurre la diffusione del fenomeno dell'antibiotico-resistenza. La resistenza agli antibiotici è di per sé un fenomeno naturale e come tale non sorprende il riscontro di ceppi antibiotico-resistenti in animali selvatici anche in aree remote del globo. I dati disponibili (Greig et al. 2015) mostrano che numerose specie di animali selvatici sono portatori di batteri antimicrobici resistenti in una vasta gamma di habitat, il che solleva la questione del loro ruolo nelle dinamiche di diffusione e mantenimento all'interfaccia tra popolazioni umane, animali domestici ed ecosistemi naturali. La presenza nella fauna selvatica, normalmente non sottoposta a trattamenti antibiotici, di ceppi batterici resistenti e in generale di geni di resistenza, è verosimilmente attribuibile a fenomeni di contaminazione ambientale. Per definire il ruolo della fauna selvatica nel complesso meccanismo di diffusione e mantenimento dell'antibiotico resistenza è necessario acquisire informazioni relativamente a: quali specie di batteri sono le più frequentemente trovate resistenti ai farmaci antimicrobici nei vertebrati selvatici e la loro caratterizzazione fenotipica e soprattutto genotipica; in che modo le specie selvatiche vengono colonizzate da batteri antibiotico-resistenti e quali scambi di tali batteri avvengono tra l'uomo, gli animali domestici e la fauna selvatica; cosa caratterizza gli habitat più contaminati da batteri antibiotico-resistenti e infine quali tratti ecologici favoriscono la colonizzazione e la potenziale infezione da batteri antibiotico-resistenti nella fauna selvatica (Vittecoq et al. 2016). Sulla base dei dati disponibili sulla diffusione in Italia e nel resto del mondo dell'antibiotico resistenza nella fauna selvatica è stato progettato un studio osservazionale con l'obiettivo di raccogliere informazioni sulla presenza e diffusione dell'antibiotico-resistenza in ceppi batterici della famiglia delle Enterobacteriaceae isolati da feci di un ampio spettro di specie di fauna selvatica, presente in varie province della Lombardia con differenti gradi di urbanizzazione, procedendo quindi alla loro caratterizzazione fenotipica di resistenza e quella genotipica utilizzando metodiche di analisi metagenomica.

Materiali e Metodi

Nel periodo compreso tra la fine del 2017 e primi mesi del 2019, si è proceduto ad un campionamento non probabilistico di convenienza utilizzando sia i campioni raccolti durante le attività di sorveglianza del piano regionale fauna selvatica della Lombardia (cinghiali, ruminanti selvatici, lagomorfi, volatili), sia i campioni provenienti da attività di sorveglianza del piano Chronic Wasting Disease (cervi e caprioli) e del piano West Nile Disease (Cornacchie, Gazze).

I campioni di feci sono stati quindi processati mediante comuni metodi di microbiologia classica per ottenere l'isolamento di ceppi di Enterobacteriaceae, identificati mediante test biochimici sia in macro che micrometodo. I ceppi isolati sono stati testati con un panel di sette antibiotici (AMPICILLINA, TETRACICLINA, CEFTIOFUR, COLISTINA, KANAMICINA, GENTAMICINA, ENROFLOXACIN) per definirne il profilo fenotipico di resistenza. Ceppi di *Escherichia coli* risultati resistenti a CEFTIOFUR sono stati sottoposti ad analisi fenotipiche e genotipiche per la determinazione della presenza di enzimi ESBL. Dieci pool di ceppi di *E.coli*, raggruppati per specie di provenienza e per localizzazione geografica sono stati analizzati mediante tecniche di metagenomica per definirne i profili genotipici di resistenza. I dati fenotipici sono stati analizzati mediante metodi di statistica bayesiana per ottenere stime di prevalenza di animali carrier di ceppi resistenti e multi-resistenti e della prevalenza di ceppi resistenti e multi-resistenti e per studiare la relazione tra caratteristiche territoriali (grado di antropomorfizzazione) e prevalenza di animali carrier di ceppi resistenti. La biodiversità dei differenti profili fenotipici è stata studiata mediante la definizione dei profili di Renyi's.

Risultati

Discussioni

Bibliografia

SUMMARY

Introduction Interest in the role of wildlife in the spread and maintenance of antibiotic resistance has increased over the past 10 years. The main concern arises from the fear that any demonstration of a role of wildlife as a “reservoir” and “maintenance” of bacteria carrying resistance genes, contributing to the environmental contamination of resistant bacteria or genetic material of resistance, could compromise efforts implemented, especially in recent years, in the medical and veterinary fields to reduce the spread of the phenomenon of antibiotic resistance. Antibiotic resistance is in itself a natural phenomenon and as such it is not surprising that antibiotic-resistant strains are found in wild animals even in remote areas of the globe. Available data (Greig et al. [2015](#)) show that numerous species of wild animals are carriers of resistant antimicrobial bacteria in a wide range of habitats, which raises the question of their role in the dynamics of spread and maintenance at the interface between human populations, domestic animals and natural ecosystems. The presence in wildlife, normally not subjected to antibiotic treatments, of resistant bacterial strains and in general of resistance genes, is probably attributable to environmental contamination phenomena. To define the role of wildlife in the complex mechanism of diffusion and maintenance of antibiotic resistance, it is necessary to acquire information on: which species of bacteria are most frequently found resistant to antimicrobial drugs in wild

vertebrates and their phenotypic and above all genotypic characterization; how wild species are colonized by antibiotic-resistant bacteria and what exchanges of these bacteria take place between humans, domestic animals and wildlife; what characterizes the habitats most contaminated by antibiotic-resistant bacteria and finally which ecological traits favor colonization and potential infection with antibiotic-resistant bacteria in wildlife (Vittecoq et al. 2016). Based on the available data on the spread in Italy and in the rest of the world of antibiotic resistance in wild fauna, an observational study was designed with the aim of collecting information on the presence and spread of antibiotic resistance in bacterial strains of the Enterobacteriaceae family. isolated from faeces of a wide spectrum of wildlife species, present in various provinces of Lombardy with different degrees of urbanization, thus proceeding to their phenotypic characterization of resistance and their genotypic characterization using metagenomic analysis methods.

Materials and Methods

In the period between the end of 2017 and the first months of 2019, a non-probabilistic sampling of convenience was carried out using both the samples collected during the surveillance activities of the regional wildlife plan of Lombardy (wild boars, wild ruminants, lagomorphs, birds), and samples from surveillance activities of the Chronic Wasting Disease plan (deer and roe deer) and of the West Nile Disease plan (Cornacchie, Magpies). The stool samples were then processed using common classical microbiology methods to obtain the isolation of Enterobacteriaceae strains, identified by biochemical tests both in macro and micromethod. The isolated strains were tested with a panel of seven antibiotics (AMPICILLIN, TETRACYCLIN, CEFTIOFUR, COLISTIN, KANAMYCIN, GENTAMYCIN, ENROFLOXACIN) to define their phenotypic resistance profile. Strains of *Escherichia coli* found to be resistant to CEFTIOFUR were subjected to phenotypic and genotypic analyzes for the determination of the presence of ESBL enzymes. Ten pools of *E. coli* strains, grouped by species of origin and by geographical location, were analyzed by means of metagenomic techniques to define their genotypic resistance profiles. Phenotypic data were analyzed by Bayesian statistical methods to obtain estimates of the prevalence of carrier animals of resistant and multi-resistant strains and of the prevalence of resistant and multi-resistant strains and to study the relationship between territorial characteristics (anthropogenic gradient) and prevalence of carrier animals of resistant strains. The biodiversity of the different phenotypic profiles was studied through the definition of Renyi's profiles

Results

Discussion

Indice

SINTESI	I
SUMMARY	II
1 INTRODUZIONE	5
2 MATERIALE E METODI	10
2.1 Campionamento	10
2.2 Esami microbiologici	10
2.3 Antibigrammi	10
2.4 Identificazione dei ceppi produttori di enzimi beta-lattamasi a spettro esteso (ESBL)	12
2.4.1 Identificazione fenotipica	12
2.4.2 Identificazione genotipica	13
2.5 Analisi metagenomiche	14
2.6 Analisi dei dati	14
2.6.1 Gestione dei dataset	14
2.6.2 Metodi statistici	15
3 RISULTATI	20
3.1 Quadro generale	20
3.1.1 Territorio	20
3.1.2 Fauna selvatica	20
3.1.3 Esami microbiologici	21
3.1.4 Antibigrammi	21
3.2 Prevalenza animali carrier di ceppi resistenti	21
3.2.1 Associazione tra la prevalenza di animali carrier e caratteristiche ambientali	22
3.3 Caratterizzazione fenotipica dell'antibiotico-resistenza degli isolati batterici	22

3.3.1	Profili fenotipici di resistenza dei ceppi isolati e diversità ecologica	23
3.3.2	Caratterizzazione genomica dei ceppi ceftiofur-resistenti	23
3.4	Pool metagenomici	24
4	DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	25
4.1	Conclusioni	29
5	Raccomandazioni (max 2 pagine)	30
5.0.1	elementi gestionali e/o diagnostici	30
5.0.2	indicazioni per la ricerca	30
5.0.3	sugg per eventuali provvedimenti normativi	30
6	MODALITÀ DI DIVULGAZIONE DEI RISULTATI (1 pagina)	30
7	Bibliografia	47
8	Allegato	53
	Analisi metagenomiche (Responsabile scientifico Dr. Stefano Pongolini- U.O.2)	53
	Materiali e metodi	53
	Sequenziamento genomico	54
	Risultati	55
	Estrazione del DNA genomico	55
	SEQUENZIAMENTO GENOMICO: Preparazione del DNA genomico, delle librerie genomiche, rea- zione di sequenziamento ed analisi bioinformatiche	56
	Discussione	62
	Bibliografia	62

ELENCO DEI COLLABORATORI

- **Dr. Tranquillo Vito** U.O. 1-Responsabile scientifico del progetto.Coordinamento delle U.O., Analisi statistica dei dati fenotipici.

- **Dr. Fiocchi Alfredo** U.O. 1-Analisi microbiologiche e antibiogrammi.
- **Dr. Pongolini Stefano** U.O. 2-Coordinamento U.O. e attività di analisi metagenomiche
- **Dr. Bolzoni Luca** U.O. 2-Attività analisi metagenomiche
- **Dr. Erika Scaltriti** U.O. 2-Attività analisi metagenomiche
- **Dr. Bertoletti Irene** U.O. 3-Analisi Microbiologiche e antibiogrammi
- **Dr. Alessandro Bianchi** U.O. 3-Analisi Microbiologiche e antibiogrammi
- **Dr. Loris Alborali** U.O. 4-Analisi genomiche ceppi Cefotiofur resistenti
- **Dr. Prati Paola** U.O. 5- Attività di raccolta e invio campioni a U.O.1 per successive analisi
- **Dr. Gianni Sala** U.O. 6- Attività di raccolta e invio campioni a U.O.1 per successive analisi

Elenco delle figure

1	Andamento annuale del numero di pubblicazioni relative all'AMR nella fauna selvatica.	31
2	DDST-Test per l'identificazione fenotipica di ceppi ESBL produttori.	32
3	TDT-Test per l'identificazione fenotipica di ceppi ESBL produttori.	32
4	DAG-Direct Acyclic Graph: secondo il modello qui specificato, la probabilità di Resistenza è dipendente dalla Specie di provenienza dei campioni, dalla superficie del comune dedicata al Pascolo e dal grado di Urbanizzazione. Sia la Specie che frequenta un determinato comune sia il Pascolo sono dipendenti dal grado di Urbanizzazione. Specie e Pascolo sono indipendenti condizionalmente al grado di Urbanizzazione.	32
5	Comuni di provenienza dei campioni	33
6	Distribuzione numero di resistenze al panel di antibiotici	34
7	Distribuzione a posteriori delle stime di prevalenza di animali carrier di ceppi antibiotico-resistenti nei diversi gruppi-specie	34
8	Distribuzione a posteriori delle stime di prevalenza di animali carrier di ceppi multi-resistenti nei diversi gruppi-specie	35
9	Distribuzione a posteriori delle stime dei coefficienti di regressione del modello 2	35
10	Stima dell'effetto 'Superficie adibita al pascolo' sulla probabilità di un animale di essere carrier di ceppi antibiotico-resistenti, condizionalmente al gruppo-specie di appartenenza	36
11	Distribuzione a posteriori delle stime di prevalenza di ceppi resistenti al panel di antibiotici nei differenti gruppi-specie	36
12	Distribuzione della frequenza dei differenti profili fenotipici di resistenza	37
13	Distribuzione della frequenza di fenotipi di resistenza nei diversi gruppi specie	37
14	Profili di diversità dei fenotipi di ceppi resistenti nei diversi gruppi specie (Reny's entropy standardized)	38

Elenco delle tabelle

1	Caratterizzazione territoriale e demografica dei comuni di provenienza dei campioni	33
2	Distribuzione del numero di campioni di feci in base alle differenti specie di fauna selvatica di origine, raggruppati per il gruppo-specie di appartenenza	39
3	Distribuzione del numero di campioni di feci in base alle caratteristiche territoriali di provenienza per i differenti gruppo-specie di appartenenza (NM= Non Montani, P= Parzialmente Montani, T= Totalmente Montani)	41
4	Distribuzione del numero di campioni di feci in base al grado di urbanizzazione dei comuni di provenienza per i differenti gruppo-specie di appartenenza (UA= Urbanizzazione ALta, UM= Urbanizzazione Media, UB= Urbanizzazione Bassa)	41
5	Distribuzione del numero e proporzione di ceppi della famiglia Enterobacteriaceae suddivise per genere, isolati dai 670 campioni di feci analizzati	41
14	Caratterizzazione genotipica dei geni di resistenza dei 47 ceppi resistenti a Ceftiofur	42
6	Stime della prevalenza di campioni resistenti suddivisi per gruppo-specie: R= numero di campioni resistenti, N= numero campioni esaminati, Prevalenza = media della distribuzione beta, inf-HPD= valore inferiore dell'intervallo HPD, sup-HPD = valore superiore dell'intervallo HPD	42
7	Stime della prevalenza di campioni multi-resistenti suddivisi per gruppo-specie: MR= numero di campioni resistenti, N= numero campioni esaminati, Prevalenza = media della distribuzione beta, inf-HPD= valore inferiore dell'intervallo HPD, sup-HPD = valore superiore dell'intervallo HPD)	45
8	Confronto tra modelli mediante K-fold cross-validation	45
9	Stime a posteriori dei parametri a effetto fisso del modello 2	45
10	Stime bayesiane della prevalenza di ceppi resistenti ai differenti antibiotici	45
11	Profilo di resistenza dei ceppi ai diversi antibiotici per gruppo-specie di provenienza del campione di feci	46
12	Profilo di antibiotico-resistenza tra i diversi generi dei ceppi isolati	46
13	Valori di entropia di Renyi tra i diversi gruppi specie	46

1 INTRODUZIONE

L'Antibiotico-Resistenza (AR) è una grave minaccia per la salute in quanto compromette la capacità di trattare le infezioni sia in medicina umana che veterinaria. La resistenza agli antibiotici si sviluppa sia attraverso complessi meccanismi come la mutazione sotto la pressione selettiva, derivante dall'uso/abuso di antibiotici, sia attraverso scambi di DNA inter e intra-specifici, principalmente mediante il trasferimento orizzontale di geni di resistenza localizzati su plasmidi che rappresenta il più importante meccanismo all'origine dell'acquisizione della resistenza in batteri patogeni rilevanti per la salute umana (Carattoli [2013](#)).

La principale strategia per ridurre l'incidenza del fenomeno antibiotico-resistenza si basa sulla riduzione dell'uso degli antibiotici sia nell'uomo che negli animali domestici, considerando che risulta chiaro che entrambi i comparti sono strettamente collegati e co-partecipano al mantenimento e alla diffusione di batteri resistenti e di geni di resistenza (Angulo, Nargund, and Chiller [2004](#)). Queste misure si basano sull'assunto che la resistenza antimicrobica è associata riduzione dell'efficienza riproduttiva (fitness cost). In assenza quindi di una pressione selettiva legata ai farmaci antimicrobici, si ha una riduzione dell'efficienza riproduttiva dei ceppi resistenti a vantaggio dei ceppi sensibili, anche se sembra che questi costi fitness siano estremamente variabili (Andersson and Hughes [2010](#)) e possano essere ridotti o addirittura trasformati in benefici per il fitness da mutazioni compensative (Luo et al. [2005](#)).

Va ricordato che batteri portatori di geni di resistenza si trovano naturalmente nei suoli in assenza di farmaci antimicrobici antropogenici a causa della produzione naturale di molecole antibiotiche da parte di alcuni batteri e funghi (Knapp [2013](#)). Il serbatoio di geni di resistenza nell'ambiente (resistoma ambientale) è quindi un mix di resistenza naturale e quella dovuta alle deiezioni di animali e uomini, a cui si possono aggiungere gli effetti selettivi di inquinanti, che possono co-selezionare elementi genetici mobili che trasportano più geni di resistenza. A questo proposito è stato stabilito che anche basse concentrazioni di antibiotici e metalli pesanti possono avere attività selettiva e indurre antibiotico-resistenza (Baker-Austin et al. [2006](#); Gullberg et al. [2011](#); Kohanski, DePristo, and Collins [2010](#)). La contaminazione ambientale dei determinanti di antibiotico-resistenza, può contribuire all'insorgenza e proliferazione di patogeni difficili o addirittura impossibili da trattare. In considerazione del potenziale impatto negativo sia sulla salute che economico della proliferazione ambientale di batteri antibiotico-resistenti, molti ricercatori, in linea con l'approccio One Health (Robinson et al. [2016](#)) includono nelle valutazioni dell'antibiotico resistenza, anche la contaminazione ambientale del suolo, dell'acqua e della fauna selvatica (Allen et al. [2010](#)).

I dati disponibili mostrano che numerose specie di animali selvatici sono portatori di batteri antimicrobici resistenti in una vasta gamma di habitat, il che solleva la questione del loro ruolo nelle dinamiche di diffusione e mantenimento all'interfaccia tra popolazioni umane, animali domestici ed ecosistemi naturali. La presenza nella fauna selvatica, normalmente non sottoposta a trattamenti antibiotici, di ceppi batterici resistenti e in generale di geni di resistenza, è

verosimilmente attribuibile a fenomeni di contaminazione ambientale. Per definire il ruolo della fauna selvatica nel complesso meccanismo di diffusione e mantenimento dell'antibiotico resistenza è necessario acquisire informazioni relativamente a: quali specie di batteri sono le più frequentemente trovate resistenti ai farmaci antimicrobici nei vertebrati selvatici e la loro caratterizzazione fenotipica e soprattutto genotipica; in che modo le specie selvatiche vengono colonizzate da batteri antibiotico-resistenti e quali scambi di tali batteri avvengono tra l'uomo, gli animali domestici e la fauna selvatica; cosa caratterizza gli habitat più contaminati da batteri antibiotico-resistenti e infine quali tratti ecologici favoriscono la colonizzazione e la potenziale infezione da batteri antibiotico-resistenti nella fauna selvatica (Vittecoq et al. [2016](#)).

L'interesse per il ruolo della fauna selvatica nella diffusione e nel mantenimento dell'antibiotico-resistenza è aumentato nel corso degli ultimi 10 anni, con un costante aumento della produzione scientifica, come evidenziato in (Fig1). La principale preoccupazione nasce dal timore che l'eventuale dimostrazione di un ruolo della fauna selvatica come "serbatoio" e "mantenimento" di batteri portatori di geni di resistenza, contribuendo alla contaminazione ambientale di batteri resistenti o materiale genetico di resistenza, possa compromettere gli sforzi messi in atto, soprattutto in questi ultimi anni, in campo medico e veterinario per ridurre la diffusione del fenomeno della resistenza agli antibiotici.

Una scoping review pubblicata nel 2015 (Greig et al. [2015](#)), ha evidenziato la presenza di 866 articoli di ricerca primaria; Oltre il 90% sono studi osservazionali; la maggioranza riportano i dati di prevalenza per AR nella fauna selvatica (551/866, 63.6%). Ci sono 176 di 866 (20,3%) studi di genotipizzazione. AR è più frequentemente studiata in *E. coli* 150 di 866 (17,3%), *Salmonella* 83 di 866 (9,6%) e *Enterococcus* 48 di 866 (5,5%). I gruppi specie di fauna selvatica più frequentemente studiati sono uccelli 410 su 866 (47,3%), cervidi, 133 di 866 (15,4%) e roditori 91 di 866 (10,5%). Le modalità di trasmissione dell'AR è riportata in 110 articoli (12,7%). Tra le caratteristiche ambientali che sono state segnalate come fattori di rischio per il trasferimento di batteri patogeni e /o AR vi sono: condivisione di ambienti 161 di 866 (18,6%), infestazione o mancanza di controllo degli uccelli selvatici 124 di 866 (14,3%) e delle fonti idriche condivise 98 di 866 (11,3%). Le pratiche di mitigazione, strategie o programmi per ridurre la trasmissione di batteri e / o AR sono stati discussi o studiati in 124 su 866 (14,3%) articoli. Sono state fornite informazioni circa i tassi di contatto tra fauna selvatica e animali domestici in 29 articoli (3,3%). È interessante notare che numerosi articoli di ricerca primaria (122/866, 14.1%) hanno riportato associazioni per i fattori di rischio di trasmissione di AR o batteri patogeni dalla fauna selvatica agli animali cibo, fonti ambientali o umani.

Uno dei primi lavori in Italia sull'AR nella fauna selvatica è stato condotto da (Pagano et al. [1985](#)) in ruminanti selvatici e marmotte del parco Nazionale dello Stelvio, in cui su 121 campioni di feci esaminati furono individuati 17 ceppi di *E.coli* antibiotico-resistenti. Nel 1991 (Caprioli et al. [1991](#)) su 81 campioni di feci da mammiferi selvatici (ruminanti, marmotta) del Parco Nazionale dello Stelvio sono stati osservati complessivamente 18 ceppi di *E.coli* antibiotico-resistenti. I ceppi isolati hanno mostrato un profilo di multiresistenza. Gli Autori hanno concluso che i

ceppi di *E. coli* in animali selvatici possono essere resistenti a diversi agenti antimicrobici e portatori di plasmidi R, anche se il microbioma intestinale degli animali selvatici non è direttamente esposta agli antibiotici. Così una possibile fonte di AR in *E.coli* potrebbero essere quegli esseri umani e animali domestici carrier di batteri antibiotico-resistenti che condividono gli stessi habitat (turisti, animali domestici pascolo) di animali della fauna selvatica.

Più recentemente sono stati pubblicati nuovi lavori che riguardano la presenza di antibiotico-resistenza in feci di animali selvatici in varie regioni d'Italia con particolare riferimento alle Enterobacteriacee e in particolare *E.coli* come microrganismo target.

Giacopello et al. (2016) hanno condotto nel 2013 uno studio osservazionale su 55 tamponi cloacali di diverse specie di avifauna selvatica raccolti da animali ospitati per varie cause presso un centro di recupero per volatili feriti della provincia di Messina. Dai tamponi sono stati isolati 83 ceppi appartenenti alle Enterobacteriacee sottoposti a test di suscettibilità ad un pannello di 16 antibiotici. La resistenza a Trimethoprim/Sulfamethoxazolo è risultata la più frequente fino ad un massimo dell'100% nel gruppo dei passeriformi, del 94% negli uccelli volatili e dell'84% nei rapaci. Importanti livelli di resistenza sono stati osservati anche nei confronti di streptomina, amoxicillina/clavulanico e ampicillina. I livelli di suscettibilità più elevati sono stati osservati verso antibiotici della famiglia delle cefalosporine. Sono state osservate differenze nel profilo di resistenza dei diversi gruppi tassonomici di avifauna indagata.

Camarda et al. (2006) riportano i risultati di uno studio osservazionale su 48 ceppi di *Escherichia coli* isolati da tamponi cloacali, raccolti nel 2002, in una colonia stanziale nella baia di Gallipoli (Lecce) di esemplari di Gabbiano corso (*Larus audouinii*). I test di suscettibilità hanno mostrato una resistenza mediamente scarsa con oltre il 50% dei ceppi suscettibili a tutto il panel di antibiotici testati, il 30% resistente ad un solo antibiotico e il restante 20% resistente a 2 o più antibiotici.

Foti et al. (2011) hanno condotto uno studio osservazionale nel 2006 su campioni di uccelli migratori durante il loro passaggio sopra il territorio di Ustica in Sicilia. Sono stati raccolti 218 tamponi cloacali e 21 contenuti intestinali provenienti da soggetti rinvenuti morti. Sono stati isolati 183 ceppi di batteri appartenenti alla famiglia delle Enterobacteriaceae e quasi tutti hanno mostrato un'elevata frequenza di suscettibilità al panel di antibiotici utilizzato. Le maggiori resistenze sono state osservate nei confronti di Ampicillina, Amoxicillina-Acido Clavulanico e Streptomina.

Sempre Foti et al. (2017) in uno studio osservazionale nel 2010 durante la migrazione annuale dei passeriformi nel territorio di Metaponto in Basilicata, hanno raccolto 121 tamponi cloacali di soggetti appartenenti all'ordine dei passeriformi da cui sono stati isolati 122 ceppi di Enterobacteriaceae. Lo studio di suscettibilità agli antibiotici ha mostrato una rilevante frequenza (superiore al 50%) di fenotipi di resistenza in particolare nei confronti di Ampicillina, Amoxicillina, Rifampicina e Amoxicillina-Acido Clavulanico. Rilevante è risultato di circa il 25% dei ceppi resistenti a Imipenem e circa il 7% di ceppi resistenti a Meropenem.

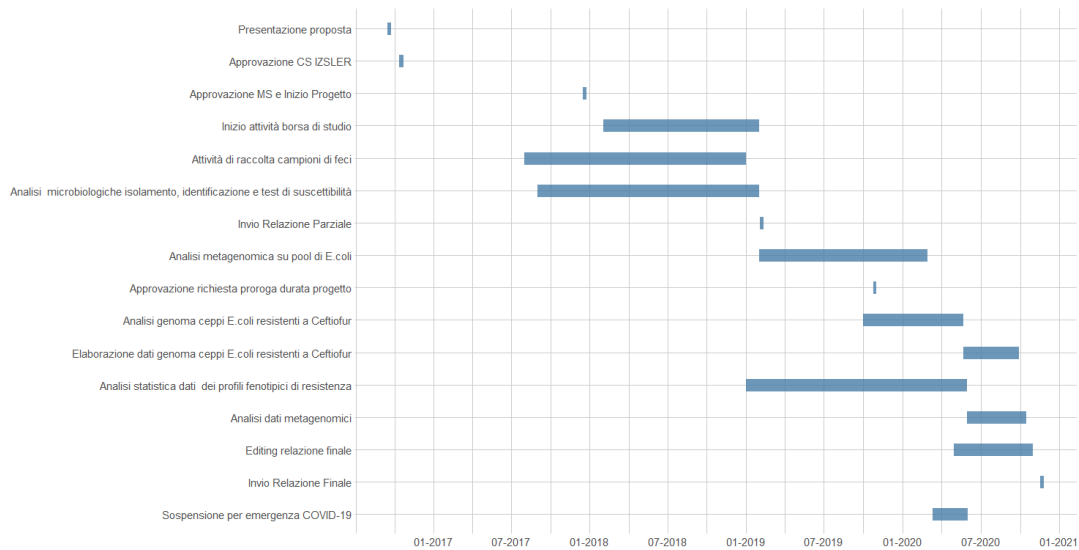
Uno studio osservazionale condotto nel territorio del Parco Nazionale dell'Aspromonte in Calabria nel periodo dal 2015-2017 da Foti et al. (2018) ha permesso di studiare la diffusione dell'antibiotico-resistenza in ceppi di Enterobacteriaceae da mammiferi selvatici (Volpe, Mustelidi, Gatto selvatico e Lupo) utilizzando campioni di feci raccolti direttamente dall'ambiente. Sono stati isolati 221 ceppi di Enterobacteriaceae che hanno mostrato importanti frequenze di antibiotico-resistenza nei confronti di un panel di 20 antibiotici appartenenti a 10 differenti classi. In particolare viene sottolineato l'alta frequenza di ceppi resistenti al gruppo delle penicillinasi (amoxicillina, ampicillina e amoxicillina-ac.clavulanico), alle tetracicline e agli aminoglicosidi.

Bonardi et al. (2018) nel 2017-18 hanno condotto uno studio con l'obiettivo di evidenziare la presenza di Escherichia coli ESBP produttori a partire da isolati di E.coli da linfonodi mesenterici di Cinghiali, abbattuti nella provincia di Parma. Un solo ceppo di Escherichia coli su 108 esaminati, è risultato ESBP produttore dal punto di vista fenotipico e confermato genotipicamente attraverso l'evidenziazione del gene *bla_{TEM}*.

Turchi et al. (2019) hanno condotto uno studio osservazionale nel Parco Regionale delle Alpi Apuane in Toscana, focalizzando l'attenzione sul profilo fenotipico e genotipico di 71 ceppi di Escherichia coli isolati da 85 campioni di feci di mammiferi selvatici di diverse specie tra cui ungulati, carnivori e lagomorfi. La più alta frequenza di antibiotico-resistenze è stata osservata fenotipicamente in cefalotina (39%) e ampicillina (34%). Il 39% dei ceppi sono risultati negativi ai test d'identificazione dei geni di resistenza.

L'attività routinaria nel periodo tra il 2002 e il 2016 (anno di presentazione di questo progetto di ricerca) presso l'IZSLER mostra che sono stati eseguiti 404 antibiogrammi di ceppi di batteri isolati da animali selvatici. Tutti questi ceppi mostrano resistenza ad almeno un antibiotico. Nel 96% si è osservata multi-resistenza; 77% erano ceppi di Salmonella spp isolati da oltre 300 cinghiali. E. coli è stato il secondo ceppo più analizzato (51). Tra le altre specie di fauna selvatica indagate ci sono: 27 ruminanti, 22 uccelli, 42 lepri, 2 volpi e un riccio. Questi dati sono indicativi della presenza e della circolazione di batteri antibiotico-resistente e geni di antibiotico-resistenza nella fauna selvatica della Lombardia.

Sulla base di questi dati è stato progettato un studio osservazionale con l'obiettivo di raccogliere informazioni sulla presenza e diffusione dell'antibiotico-resistenza in ceppi batterici della famiglia delle Enterobacteriaceae isolati da feci di un ampio spettro di specie di fauna selvatica, presente in varie province della Lombardia con differenti gradi di urbanizzazione; la loro caratterizzazione fenotipica di resistenza e quella genotipica utilizzando metodiche di analisi metagenomica su pools di ceppi batterici di Escherichia coli. Nella seguente figura è riportato il timeline delle diverse attività svolte per la realizzazione degli obiettivi del progetto.



A Ottobre del 2019 è stata chiesta e ottenuta una proroga del progetto sulla base dei primi risultati ottenuti dall'U.O.2 impegnata nelle analisi metagenomiche. Si è colta l'occasione della proroga dei tempi per integrare i risultati indagando nello specifico i profili genetici di ceppi di *Escherichia coli* risultati resistenti a Cefotiofur per evidenziare la presenza di geni di resistenza ESBL.

Nel marzo 2020 a seguito dell'emergenza COVID le attività del progetto ancora in corso sono state sospese e riprese a partire dalla fine di maggio 2020.

2 MATERIALE E METODI

2.1 Campionamento

Si è proceduto ad un campionamento non probabilistico di convenienza utilizzando sia i campioni raccolti durante le attività di sorveglianza del piano regionale fauna selvatica della Lombardia (cinghiali, ruminanti selvatici, lagomorfi, volatili), sia i campioni provenienti da attività di sorveglianza del piano Chronic Wasting Disease (cervi e caprioli) e del piano West Nile Disease (Cornacchie, Gazze). I campioni di feci raccolti dall'intestino degli animali, direttamente in campo per i mammiferi abbattuti durante la stagione venatoria (prevalentemente cinghiali), o durante la necropsopia per gli animali rinvenuti morti o volatili abbattuti nell'ambito dei piani di monitoraggio, sono stati stoccati a temperatura di congelamento in attesa di essere processati. La raccolta dei campioni è avvenuta %>%

2.2 Esami microbiologici

L'esame batteriologico è stato eseguito seguendo le indicazioni riportate nel metodo di prova interno IZSLER che descrive la tecnica microbiologica per la categorizzazione di isolati batterici aerobi/anaerobi facoltativi. I campioni di feci confezionati in sacchetti o barattoli o prelevati direttamente in sede necroscopica dall'intestino, sono stati disciolti in brodo di pre-arricchimento APT (acqua peptonata) e, dopo l'allestimento di tamponi, sono stati seminati su MC-Conkey Agar (terreno selettivo per enterobatteriacee) e incubati per 24-48 ore a 37°C in aerobiosi al fine di ottenere colonie isolate. Da una colonia isolata sono state realizzate colture su terreno solido Klieger Iron Agar (KIA) da utilizzare nelle successive prove di caratterizzazione (morfologica, colturale, biochimica). Il KIA costituisce un terreno differenziale impiegato principalmente come ausilio nell'identificazione di alcuni membri della famiglia delle Enterobacteriaceae. La differenziazione degli enterobatteri avviene in base alla loro capacità di fermentare il destrio ed il lattosio e di produrre idrogeno solforato. Tutti i campioni sono stati successivamente sottoposti alla prova della citocromo ossidasi. Quelli risultanti ossidativi e fermentativi alla coltura su terreno Klieger sono stati testati per confermare fossero E.Coli (ossidasi negativo). I campioni risultati ossidasi positivi sono stati invece identificati con analisi biochimica mediante gallerie utilizzando il kit Microgen TM GnA + B-ID System.

2.3 Antibiogrammi

Tutti i ceppi isolati sono stati sottoposti al test di sensibilità agli antibiotici mediante la tecnica di diffusione in agar gel descritta nel metodo di prova interno per l'esecuzione dell'antibiogramma dell'IZSLER, redatto in conformità con le linee guida nazionali del Centro di Referenza per l'Antibiotico Resistenza (CRAB) e le linee guida internazionali del

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). E' stato utilizzato un panel di 7 antibiotici scelti sulla base delle Linee Guida per l'interpretazione delle prove di sensibilità ai chemioantibiotici del Centro di Referenza Nazionale per l'Antibiotico-resistenza (<http://www.izslt.it/crab/wp-content/uploads/sites/8/2017/03/Molecole-prototipo-e-loro-equivalenti-in-vitro-rev-3-2015.pdf>). Le molecole selezionate sono indicate come molecole prototipo rappresentative delle diverse classi farmacologiche:

Ampicillina (AMP). Molecola prototipo di Beta-lattamici tipo Amoxicillina, Etacillina. Antibiotico classificato dal WHO (Organization and others 2019) come **Critically Important Antimicrobial** e **High priority** in quanto incontra i criteri C1 e C2 dei criteri di categorizzazione e i criteri P2, e P3 dei criteri di prioritizzazione. Antibiotico a largo spettro di azione, usato in medicina umana e veterinaria sin dal 1961. L'ampicillina impedisce la formazione dei legami crociati tra le varie molecole di peptidoglicano (mureina), un componente fondamentale della parete cellulare batterica, e ne compromette la stabilità, rendendo così i batteri suscettibili allo shock osmotico. Alcuni batteri produttori dell'enzima beta-lattamasi (penicillinasi) possono inattivare l'antibiotico rendendo così il trattamento inefficace. E' uno dei pochi antibiotici attivo contro i ceppi multiresistenti di *Enterococcus faecalis* e *E.faecium*.

Tetraciclina (TET). Molecola prototipo di Clortetraciclina, Doxyciclina, Minociclina, Oxytetraciclina, classificato dal WHO come **Highly important** antimicrobial, in quanto incontra solo il criterio C2 di classificazione. Antibiotico a largo spettro d'azione in uso dal 1978 sia in medicina umana che veterinaria. Batteriostatico, penetra nella cellula complessata a Mg 2+ . Lega la sub-unità 30S impedendo l'accesso degli aminoacil-tRNA al sito recettoriale A del ribosoma;I batteri di solito acquisiscono resistenza alla tetraciclina dal trasferimento orizzontale di un gene che codifica per una pompa di efflusso o una proteina di protezione ribosomiale. Le pompe Efflux espellono attivamente la tetraciclina dalla cellula, impedendo l'accumulo di una concentrazione inibente della tetraciclina nel citoplasma (Chopra and Roberts 2001). Le proteine di protezione ribosomiale interagiscono con il ribosoma e rimuovono la tetraciclina dal ribosoma, consentendo di continuare la traduzione (Connell et al. 2003).

Ceftiofur (CFT). Molecola prototipo di Cefalosporine a spettro esteso di 3[^], 4[^] e 5[^] generazione come Cefoperazone, Cefpodoxime e Cefquinome, classificate dal WHO come **Critically Important Antimicrobial**, perchè incontrano i criteri C1, C2 e C3 e **Highest Priority** perchè soddisfano i criteri di priorità P1, P2 e P3. In particolare le cefalosporine di 3[^] e più alte generazioni sono conosciute come in grado di selezionare ceppi resistenti di Salmonella spp e di Escherichia coli negli animali, e allo stesso tempo sono uno dei pochi strumenti terapeutici a disposizione per forme gravi di Salmonellosi e infezioni da E.coli nell'uomo e in particolare nei bambini.

Colistina (COL). Molecole non appartenente al panel consigliato dalla linee guida in quanto particolarmente critico per l'utilizzo in umana. E' classificata dal WHO come **Critically Important Antimicrobial** e **Highest Priority**. Le polymixine, gruppo farmacologico a cui appartiene la colistina, sono conosciute per selezionare E.coli polymixin-resistenti mediate da plasmidi. La somministrazione intravenosa di polymixina è uno dei pochi strumenti terapeutici

efficaci per gravi forme di infezioni nosocomiali da E.coli e Pseudomonas aeruginosa multi-resistenti in molti paesi, soprattutto nei pazienti in condizioni critiche. E' stato inserito nel panel per verificare la presenza di resistenza a questo importante antibiotico in ceppi provenienti dalla fauna selvatica come misura del grado di contaminazione degli ambienti selvatici da parte di ceppi portatori di resistenza alle polymixine.

Kanamicina (KAN). Molecola prototipo degli Aminoglicosidi tra cui le streptomicine (isolate da attinomiceti del genere Streptomyces) quali Neomicina e Framicetina. Classificate dal WHO **Critically Important Antimicrobial** in quanto soddisfa i criteri C1 e C2 e **Highly important** in quanto soddisfa solo P2 e P3 tra i fattori di prioritizzazione.

Gentamicina (GEN). Molecola prototipo di Aminoglicosidi isolati da actinomiceti del genere Micromonospora quali Tobramicina, Apamicina, classificata come **Critically Important Antimicrobial** in quanto soddisfa i criteri C1 e C2 e **Highly important** in quanto soddisfa solo P2 e P3 tra i fattori di prioritizzazione.

Enrofloxacin (ENR). Molecola prototipo dei fluorochinolonici, tra cui Danofloxacin, Ciprofloxacin, Marbofloxacin, Orbifloxacin, Pradofloxacin. Antibiotici classificati da WHO come **Critically Important Antimicrobial** e **Highest Priority** in quanto soddisfano sia i criteri d'importanza C1, C2 e C3 sia i fattori di prioritizzazione P1, P2 e P3). Sono antibiotici conosciuti per selezionare negli animali ceppi di E.coli e Salmonella spp resistenti ai chinoloni che sono tra i pochi strumenti terapeutici nel caso di gravi forme di infezioni da Salmonella e E.coli.

2.4 Identificazione dei ceppi produttori di enzimi beta-lattamasi a spettro esteso (ESBL)

2.4.1 Identificazione fenotipica

Analogamente a quanto fatto da (Vo et al. 2007) il criterio di selezione dei ceppi da sottoporre ad esame fenotipico per l'identificazione di ceppi potenziali produttori di enzimi beta-lattamasi a spettro esteso (ESBL) è stato la resistenza alle cefalosporine (CEFTIOFUR). Si è proceduto a sottoporre questi ceppi a due test fenotipici per l'identificazione di ESBL: il Double Disk Synergy test (DDST) e il Three Dimensional Test (TDT), come descritti da vari Autori.

Il DDST (Philippon et al. 1989) consiste nell'utilizzo combinato di due antibiotici, la cefalosporina (Cefquinome o Cefotiofur) e Amoxicillina+Acido Clavulanico (30µg), inibitore delle β -lattamasi a spettro esteso. I due dischetti vengono posizionati ad una distanza di 20 mm centro-centro su una piastra di MHA (Mueller-Hinton Agar), precedentemente inoculata con la soluzione del ceppo da testare (torbidità pari a 0.5 McFarland). Se il ceppo è un produttore di ESBL, allora si ottiene una estensione dell'alone di inibizione dall'Amoxicillina+Acido Clavulanico verso il dischetto della cefalosporina (Fig.2).

Un secondo metodo per rilevare ceppi produttori di ESBL è il Three Dimensional Test (TDT) (Irfan et al. 2013) . Il TDT prevede l'inoculo di un ceppo di Escherichia coli sensibile agli antibiotici β -lattamici (E. coli ATCC 25922),

con torbidità pari a 0.5 McFarland, su una piastra di MHA. Al centro della piastra viene posizionato un dischetto di Ceftiofur (30µg) e, ad una distanza di circa 2mm, viene effettuato un foro nel terreno di coltura. All'interno del foro vengono inoculati 30µl della soluzione in TSB del ceppo da testare, tarata ad una torbidità di 0.5 McFarland. La piastra viene incubata a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ per 18-24 h. Se attorno al dischetto di antibiotico si presenta una distorsione dell'alone di crescita a forma di cuore, allora il ceppo testato risulta un produttore di ESBL (Fig.3).

2.4.2 Identificazione genotipica

Tutti i ceppi risultati CFT-resistenti, indipendentemente dal risultato dei test ESBL fenotipici, sono stati processati per la caratterizzazione genomica. I ceppi preventivamente congelati e poi inviati all'U.O.3, sono stati sottoposti a esame batteriologico, per confermarne la vitalità e l'identificazione di specie, con semina su piastre di agar MacConkey e di agar sangue (Oxoid, Italia) e successiva incubazione in aerobiosi per 18 ± 2 ore a $37 \pm 2^\circ\text{C}$. Le colonie sospette di E. coli sono state identificate morfologicamente colorazione di Gram. Si è quindi proceduto a prelevare una colonia sospetta e seminata in BHI (Brain Heart Infusion) agar inclinato (Oxoid, Italia) e l'identificazione è stata condotta tramite il metodo biochimico API 20E (bioMérieux, Francia). Per l'indagine ESBL, una colonia sospetta di E. coli è stata inoculata in 1 ml di brodo BHI con supplemento di 1 mg/L di cefotaxime per la fase di pre-arricchiamento. In seguito ad incubazione overnight, una goccia di BHI brodo è stata seminata su agar MacConkey con supplemento di 1 mg/L di cefotaxime. I ceppi positivi sono stati identificati attraverso la crescita di colonie rosa-rosa scuro ed una di queste è stata prelevata per le successive analisi molecolari. Una singola colonia batterica per campione è stata risospesa in 250 µl di acqua DNasi-RNasi free e il DNA è stato estratto mediante lisi-ebollizione (98°C per 10 minuti). Il gruppo filogenetico di ciascun isolato è stato determinato attraverso una PCR multiplex che discrimina i sette gruppi principali (A, B1, B2, C, D, E o F) come descritto da (Clermont et al. 2013). La rilevazione dei geni di resistenza presenti negli isolati è stata eseguita utilizzando un pannello di reazioni PCR. I geni del gruppo CTX-M sono stati analizzati tramite PCR multiplex, la cui positività singola o multipla, identifica i cinque gruppi filogenetici principali: CTX-M1, CTX-M2, CTX-M9 e CTX-M8 e CTX-M25 (Woodford, Fagan, and Ellington 2006). Inoltre, singole reazioni PCR sono state utilizzate per il gene SHV (Arlet, Rouveau, and Philippon 1997), il gene TEM (Mabilat et al. 1990), utilizzando primer universali come precedentemente descritto ((Chang et al. 2001); (Ahmed et al. 2007); (Crement et al. 2011); (Gbonon et al. 2018)) e geni AmpC (CMY-2, CMY-4, CMY-6, CMY-7, CMY-12, CMY-13, CMY-14, CMY-18, LAT-3) (Dierikx et al. 2010). La ricerca dei geni mcr (plasmid-mediated colistin resistance determinants), mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr-4 and mcr-5, è stata condotta tramite PCR multiplex come descritto da (Rebelo et al. 2018).

2.5 Analisi metagenomiche

2.6 Analisi dei dati

2.6.1 Gestione dei dataset

I dati raccolti sono stati inseriti in foglio elettronico denominato **AMR** in formato googlesheet e quindi importato in ambiente R(R Core Team 2020) per le successive analisi. **AMR** risulta costituito da 911 righe e 23 colonne. Ogni riga corrisponde ad un isolato batterico sottoposto al test di sensibilità al panel di antibiotici identificati da una variabile univoca denominata **IDceppo**. La variabile **IDcamp** identifica il campione di feci sottoposto ad analisi micorbiologica per l'isolamento e identificazione dei ceppi di *Enterobacteriacee* :

- **SPECIE** variabile categorica che riporta la specie di provenienza dei campioni di feci. Questa variabile contiene 33 livelli differenti che comporta una eccessiva parcellizzazione dei dati con presenza di poche unità per alcune specie. Si è quindi proceduto ad aggregare le specie sulla base di considerazioni tassonomiche e ecologiche in nove gruppi specie identificati dalla variabile **Specieaggreg**
- **COMUNE** variabile categorica che riporta i comuni di provenienza dei campioni di feci. Per 24 campioni di feci non era disponibile il dato relativo al Comune di provenienza.
- **Identificazione** variabile categorica che riporta il genere di appartenenza dei ceppi isolati
- **AMP** (Ampicillina), **COL** (Colistina), **CFT** (Ceftiofur), **KAN** (Kanamicina), **ENR** (Enrofloxacin), **GEN** (Gentamicina), **TET** (Tetraciclina) : variabili dicotomiche che identificano la Sensibilità o Resistenza ai differenti antibiotici del panel.

Altre variabili presenti nel dataset ma non utilizzate per l'analisi dei dati sono: **FASCETTA** (identificativo, quando presente, dell'animale da cui proviene il campione di feci), **DATA_PRELIEVO**, **DATA_SEMINA**, **STATO_CAMPIONE** (se fresco o congelato), **til** (tilmicosina), **ox** (oxacillina), **er** (eritromicina): questi tre antibiotici sono stati tutti utilizzati durante il test di sensibilità agli antibiotici, ma come da indicazione del centro di referenza per l'antibiotico-resistenza le **Enterobatteriacee** mostrano resistenza naturale, quindi i rispettivi risultati non sono stati utilizzati per le successive analisi dei dati.

Il dataset AMR ha una struttura gerarchica costituita da tre livelli: Comune, IDCamp, e IDceppo. I comuni contribuiscono con uno o più campioni di feci provenienti da diverse specie animali; da un singolo campione di feci identificato dal IDcamp, possono essere isolati da uno a più ceppi batterici appartenente alla famiglia delle enterobatteriacee iden-

tificati dal IDceppo. Le statistiche relative ai campioni di feci sono quindi state ottenute escludendo per i campioni con più di un ceppo i record multipli con differente IDceppo ma identico IDcamp.

Le caratteristiche dei differenti comuni di provenienza dei campioni sono state ottenute da differenti database dell'I-STAT consultabili al sito (<https://www.istat.it/it/>) e quindi collegate al dataset AMR mediante il campo COMUNE, ottenendo quindi il dataset **AMR_istat**, costituito da 876 record, utilizzato per analizzare l'associazione tre caratteristiche ambientali-sociali dei differenti comuni e la prevalenza di animali portatori di enterobattericee resistenti ad almeno un antibiotico del panel indagato.

Le caratteristiche dei comuni utilizzate sono: **denpop(abkmq)** (densità di popolazione espressa in abitanti per Km²), **sup(kmq)** (superficie del comune in km²), **urb** (grado di urbanizzazione: variabile categorica con tre livelli: 1=densamente popolato, 2=mediamente popolato, 3=scarsamente popolato (rurale)), **hapasc** (ettari di territorio dedicati al pascolo), **capi** (numero di capi al pascolo), **aziende** (numero di aziende con animali al pascolo), **montano** (montanità del territorio), **altcentro** (altitudine in metri del comune).

2.6.2 Metodi statistici

Prevalenza animali portatori di ceppi resistenti e multiresistenti. Sulla base dei profili di resistenza dei singoli ceppi si è provveduto a classificare i ceppi in Suscettibili (ceppi sensibili a tutti gli antibiotici del panel) e Resistenti (ceppi sensibili ad almeno un antibiotico del panel) e quindi a classificare come campione di feci “Resistente”, feci carrier di almeno un ceppo resistente ad almeno un antibiotico del panel indagato. Le stime puntuali e intervallari della prevalenza complessiva e specifica per gruppo-specie dei campioni “Resistenti” sono state stimate mediante l'impiego di una distribuzione Beta a priori coniugata sulla distribuzione di p (probabilità di essere un ceppo resistente) in un esperimento binomiale ottenendo una distribuzione Beta a posteriori della probabilità P . Dal teorema di Bayes la distribuzione a posteriori di p condizionalmene ai dati osservati è data da:

$$p|x = \text{Beta}(x + \alpha, n - x + \beta)$$

dove: p = probabilità di un campione di feci resistente (secondo la definizione data sopra); n = numero di osservazioni; x = numero di campioni resistenti; α e β sono gli iperparametri della distribuzione a priori beta di p , che in questo caso è una Jeffrey's prior con distribuzione Beta(0.5, 0.5). Dalla distribuzione posteriore viene costruito quindi un intervallo di credibilità che raccoglie la più alta probabilità di densità di valori di p (HPD) corrispondente al 95% dei valori di p stimati. La stima puntuale della prevalenza è rappresentata dalla media della distribuzione Beta a posteriori data da:

$$mean = (x + 0.5)/(n + 1)$$

I risultati sono restituiti in forma tabellare e grafica mediante l'utilizzo del pacchetto binom (Dorai-Raj 2014) in ambiente R.

La stessa procedura è stata utilizzata per stimare la prevalenza di campioni di feci carrier di almeno un ceppo risultato multi-resistente (MR), dove per multi-resistenti si definiscono i ceppi resistenti a tre o più antibiotici del panel.

Associazione tra Prevalenza di animali carrier di ceppi resistenti e caratteristiche ambientali Esistono evidenze in letteratura che la presenza (prevalenza/occorrenza) di animali selvatici portatori di ceppi antimicrobico-resistenti sia da attribuire alla contaminazione ambientale e/o all'interazione tra specie domestiche e selvatiche. Per 648 campioni è risultato disponibile il dato geografico e la caratterizzazione territoriale ISTAT. Su questi campioni è stato quindi possibile valutare l'associazione tra prevalenza di capi selvatici portatori di ceppi "Resistenti" e i caratteri territoriali (usando il Comune come unità geografica) di provenienza dei campioni. Per questo tipo di valutazione sono stati esclusi i dati riferiti ai gruppi-specie meno numerosi: LEPRE, UCCELLI ACQUATICI e ALTRI VOLATILI. Dopo esclusione di questi gruppi specie, il dataset comprende informazioni su 603 campioni. I dati Istat disponibili, per esplorare l'associazione tra prevalenza di capi portatori di ceppi Resistenti e indicatori di contaminazione derivati dai singoli comuni sono: densità di popolazione (da cui deriva la classificazione del grado di urbanizzazione dell'ISTAT), superficie kmq del comune, altitudine, superficie comunale adibita a pascolo, numero di capi domestici al pascolo, numero di aziende al pascolo. Per questo studio è stato adattato un modello bayesiano multilevel specificato a priori mediante un Direct Acyclic Graph (DAG) che ha permesso di chiarire la dipendenza delle variabili e scegliere quelle da inserire nel modello (Fig4).

Formalmente il modello è il seguente:

$$R_i \sim \text{Bernoulli}(p)$$

$$\text{logit}(p) = \alpha_{\text{Comune}} + \beta * X$$

$$\alpha_{\text{Comune}} \sim \text{Normal}(\alpha, \sigma)$$

$$\alpha \sim \text{Normal}(0, 1)$$

$$\sigma \sim \text{HalfCauchy}(0, 1)$$

$$\beta \sim \text{Normal}(0, 1)$$

Dove X rappresenta la matrice dei predittori e α_{Comune} definisce il fattore con intercetta variabile. Tutte le variabili quantitative predittorie (Urbanizzazione e Pascolo) sono state standardizzate in accordo a quanto suggerisce (Gelman, Hill, and Vehtari 2020), sia per una maggior interpretabilità dei coefficienti sia per una migliore performance del motore HMCM sia per una miglior utilizzo delle priors del modello. Le stime dei parametri del modello sono state ottenute mediante campionamento con l'algoritmo Hamiltonian Monte Carlo utilizzando quattro catene, con 4000 iterazioni di cui 1000 di warmup (escluse dopo il campionamento). Per questo modello è stato utilizzato il pacchetto brms (Bürkner 2018) come interfaccia del linguaggio STAN (Gelman, Lee, and Guo 2015) implementato in R nel pacchetto rstan (Stan Development Team 2020). Si è proceduto ad adattare i seguenti modelli utilizzando i diversi predittori esplorando termini d'interazione ragionevoli dal punto di vista epidemiologico:

- modello 1 : $\text{logit}(p) = \alpha_{\text{Comune}} + \beta_{\text{Specie}} + \beta_{\text{Pascolo}} + \beta_{\text{Urbanizzazione}}$
- modello 2 : $\text{logit}(p) = \alpha_{\text{Comune}} + \beta_{\text{Specie}} + \beta_{\text{Pascolo}} + \beta_{\text{Urbanizzazione}} + \beta_{\text{Specie*Pascolo}}$
- modello 3 : $\text{logit}(p) = \alpha_{\text{Comune}} + \beta_{\text{Specie}} + \beta_{\text{Pascolo}} + \beta_{\text{Urbanizzazione}} + \beta_{\text{Specie*Pascolo}} + \beta_{\text{Specie*Urbanizzazione}}$

Il confronto tra i diversi modelli è stato effettuato mediante l'utilizzo delle tecniche di cross-validazione K-fold cross-validation con $K=10$ subset di dati (Gelman, Hill, and Vehtari 2020). Le stime a posteriori dei parametri del modello selezionato sono state quindi riassunte in forma tabellare mediante la mediana della distribuzione a posteriori, gli intervalli di credibilità al 95%, la Probability Direction (PD), come misura dell'importanza degli effetti dei parametri, e la Region of Practical Equivalence (ROPE) come indice di significatività secondo quanto riportato da (Makowski et al. 2019).

Prevalenza di ceppi resistenti e profili fenotipici di resistenza ai differenti antibiotici. Sulla base dei profili di resistenza dei singoli ceppi si è provveduto a classificare i ceppi in

- Suscettibili (ceppi sensibili a tutti gli antibiotici del panel)
- Resistenti (ceppi sensibili fino a 2 antibiotici del panel)
- Multiresistenti (ceppi sensibili a 3 o più antibiotici del panel).

Per ogni singolo antibiotico è stata stimata la distribuzione a posteriori della prevalenza di ceppi resistenti complessivamente e nelle differenti specie di provenienza dei campioni, adattando modelli bayesiani analogo al precedente a cui si rimanda.

Le distribuzioni a posteriori delle prevalenze sono state quindi riassunte mediante il calcolo della mediana e dei percentili 2.5 e 97.5, definendo quindi un intervallo di credibilità del 95%.

Biodiversità dei profili fenotipici di resistenza Sulla base delle resistenze ai differenti antibiotici del panel i ceppi sono stati caratterizzati per il loro profilo di resistenza indicato da una stringa costituita dall'abbreviazione di tre lettere degli antibiotici resistenti. Ad esempio la stringa AMP-TET-COL indica un ceppo batterico con fenotipo di resistenza a Ampicillina, Tetraciclina, e Colistina. I differenti ceppi sono stati quindi aggregati per fenotipo e per gruppo-specie di provenienza dei ceppi e analizzati mediante metodi di analisi della biodiversità calcolando quattro misure di diversità legate alle misure di entropia generalizzata di Rényi secondo l'approccio descritto da (Mather et al. 2012). L'entropia di Rényi si calcola mediante la seguente formula:

$$H_{\alpha} = \frac{Ln \sum p^{\alpha}}{1 - \alpha}$$

α rappresenta un parametro di scala, lungo il quale la ricchezza del profilo e l'abbondanza relativa dei profili sono pesate in modo differente, all'aumentare di α il peso dei profili più rari è maggiormente ridimensionato nel calcolo della diversità. Alcuni comuni indici di diversità sono relazionati all'entropia di Rényi, ad esempio quando $\alpha = 1$ si ottiene l'indice di Shannon(H). Queste relazioni sono più evidenti quando si utilizza il cosiddetto numero di Hill che è associato all'entropia H_{α} di Renyi da: $H_{\alpha} - Hill = exp(H_{\alpha})$. I quattro indici di diversità che sono stati confrontati tra i comparti rappresentati dai gruppi-specie si trovano a diversi livelli di α : con $\alpha = 0$ si ha l'equivalente della Richness che rappresenta una semplice conta dei differenti profili di resistenza e ignora la relativa abbondanza e quindi considera profili rari e comuni allo stesso modo; quando $\alpha = 1$ si ha l'equivalente dell'esponente dell'indice di Shannon che rappresenta la probabilità che due ceppi estratti a caso hanno lo stesso profilo di resistenza; quando $\alpha = 2$ si ha l'equivalente dell'inverso dell'indice S di Simpson che rappresenta l'abbondanza relativa di ogni profilo e infine con $\alpha = \infty$ si ha l'equivalente dell'inverso dell'indice di dominanza di Berger_Parker che rappresenta la proporzione dei profili più comuni nel campione. Usando l'entropia di Rényi è possibile costruire un grafico dei profili di diversità che sono più informativi di quanto non si ottenga usando i singoli indici di diversità. Curve piatte indicano che le comunità di fenotipi hanno un alto grado di uniformità con assenza di fenotipi dominanti. In caso di curve che declinano rapidamente con lunghe code, indicano comunità di fenotipi in cui sono presenti molti fenotipi rari e quindi presenza di uno o pochi fenotipi dominanti. Il confronto tra curve per siti differenti o come in questo studio per gruppo-specie differente avviene non solo attraverso la differente forma ma anche attraverso la posizione relativa rispetto all'asse delle ordinate. Affinchè vengano considerati completamente differenti due comunità sulla base della diversità le curve non devono sovrapporsi. A questo riguardo può essere utile confrontare la forma delle curve partendo da un punto in comune fisso per tutte le comunità. Al valore di $\alpha = 0$ l'entropia di Renyi è interpretabile come indice di richness. Se si sottrae il valore di entropia ad $\alpha = 0$ da tutti i valori di entropia misurati ai diversi valori di α si ottiene un grafico in cui tutte le curve partono da un punto in comune corrispondente appunto a $\alpha = 0$. In questo modo si ottiene una standardizzazione o normalizzazione delle curve con il focus di valutazione solo sulla forma delle curve

stesse. In questo studio si è proceduto quindi a stimare l'entropia di Renyi e quindi a visualizzare i risultati delle curve normalizzate di diversità delle comunità di fenotipi di resistenza dei diversi gruppi-specie, utilizzando le funzioni del pacchetto BiodiversityR, come indicato da (Kindt and Coe [2005](#))

3 RISULTATI

3.1 Quadro generale

3.1.1 Territorio

L'attività di campionamento si è svolta tra Settembre 2017 e Dicembre 2019 in sette province della Lombardia : Bergamo, Pavia, Varese, Como, Lecco e Brescia da un totale di 223 comuni (Fig5). Sulla base dei criteri di classificazione dei comuni adottati dall'ISTAT, in merito a grado di urbanizzazione, e montanità risulta che : 415 campioni (57%) provengono da comuni a bassa urbanizzazione (aree rurali scarsamente popolate), 221 campioni (30%) da comuni a densità intermedia di popolazione e 11 campioni (1.15%) da comuni ad alta densità di popolazione; 472 campioni (65%) provengono da comuni totalmente montani, 161 (22%) da comuni in pianura e 14 campioni (2%), da aree parzialmente montane (collinari). Questi risultati sono riferiti ad un totale di 647 campioni provenienti da comuni per i quali era disponibile il dato ISTAT di urbanizzazione e montanità. In tabella 1 sono riportate le statistiche descrittive della caratterizzazione geografica e di popolazione dei comuni da cui provengono i campioni.

3.1.2 Fauna selvatica

Sono stati raccolti complessivamente 670 campioni di feci da 33 differenti specie di fauna selvatica. Le specie più frequentemente campionate sono il Capriolo (*Capreolus capreolus*) con 191 campioni (28.5%), la Cornacchia grigia (*Corvus cornix*) con 122 (18.2%), il Cervo (*Cervus elaphus*) , con 80 campioni (11.9%), il Cinghiale (*Sus scrofa*) con 76 campioni (11.3%), il Camoscio (*Rupicapra rupicapra*) 46 campioni (6.9%) e il Muflone (*Ovis aries musimon*) 43 campioni (6.4%) che rappresentano complessivamente più dell'80% dei campioni esaminati. Il restante 20% è distribuito su un totale di 27 specie differenti descritte in tabella 2.

Oltre il 90% di campioni dei gruppi-specie CERVIDI, BOVIDI e SUIDI proviene da territori classificati da ISTAT come Totalmente Montani; il 75% dei campioni del gruppo CARNIVORI proviene da territori Totalmente Montani; l'86% dei campioni del gruppo CORVIDI proviene da territori Non Montani e il 50% dei campioni del gruppo RAPACI proviene da territori Totalmente Montani e il 50% da territori Non Montani. Per tutti i gruppi specie risulta poco rappresentata la categoria territoriale Parzialmente Montano (P) (tabella 3). ISTAT sulla base della densità di popolazione per Km² classifica i comuni in 3 classi di urbanizzazione: 1=densamente popolato, 2=mediamente popolato, 3=scarsamente popolato (rurale). La distribuzione dei campioni dei diversi gruppi specie rispetto alle caratteristiche di urbanizzazione dei comuni di provenienza riflette quanto già visto per la montanità dei territori campionati, con una più alta frequenza di campioni provenienti da territori rurali e a densità media che da comuni ad elevata densità di popolazione. In particolare dai territori a bassa urbanizzazione (rurali) proviene il 72% dei campioni del gruppo CERVIDI, il 75% dei

campioni del gruppo BOVIDI, il 67% dei campioni del gruppo SUIDI, il 70% dei campioni del gruppo CARNIVORI, il 57% dei campioni dal gruppo CORVIDI e il 30% dal gruppo RAPACI (tabella 4)

3.1.3 Esami microbiologici

Dai 671 campioni di feci analizzati sono stati isolati 911 ceppi batterici identificati come appartenenti alla famiglia delle Enterobacteriacee. *Escherichia coli* (E.coli) rappresenta il 67.6% dei ceppi isolati, il restante 32% dei ceppi è distribuito su un totale di 14 generi differenti (tabella 5). Per 67 ceppi non si è giunti all'identificazione basata sulle prove biochimiche di genere. Per questi ceppi non si è proceduto ad ulteriori approfondimenti diagnostici ma sono stati comunque archiviati in brodo con glicerolo e quindi congelati.

3.1.4 Antibigrammi

Sono stati eseguiti 910 antibiogrammi. Complessivamente 392 ceppi (43%) sono risultati Suscettibili (S) al panel di antibiotici testati ; 423 (46%) i ceppi Resistenti (R) fino ad un massimo di 2 antibiotici e infine 95 (10%) ceppi sono risultati Multiresistenti (MR), con resistenza a 3 o più antibiotici. La distribuzione del numero di resistenze al panel di antibiotici per isolato (Antibiogram length) è sintetizzata in figura 6

3.2 Prevalenza animali carrier di ceppi resistenti

Complessivamente da 670 campioni di feci di fauna selvatica da cui è stato isolato almeno un ceppo di *Enterobacteriacee* e su cui è stato eseguito l'antibiogramma, in 421 è stato isolato almeno un ceppo resistente ad uno o più antibiotici del panel indagato, pari ad una Prevalenza complessiva (Overall Prevalence) del 62% (95% HPD: 58-67%).

La variabilità tra i gruppi-specie è particolarmente ampia: nei CORVIDI si osserva la prevalenza più elevata (84%), mentre nei BOVIDI la più bassa (37%). A causa della bassa numerosità campionaria si osservano stime con incertezza molto ampia nei gruppi : LEPRE, ALTRI VOLATILI, UCCELLI ACQUATICI, CARNIVORI e RAPACI. In figura 7 è riportata per ogni gruppo specie la distribuzione a posteriori della prevalenza di animali carrier di ceppi antibiotico-resistenti e in tabella (6) le stime puntuali e i valori dell'intervallo di massima densità delle stime (95% High Probability Density HPD).

Su 670 campioni di feci, 92 presentano almeno un ceppo MULTI-RESISTENTE (numero di resistenze \geq a 3), pari ad una prevalenza del 14% (95% HPD:11%-16%). La variabilità tra gruppi specie risulta molto ampia: la prevalenza di animali selvatici portatori di ceppi multiresistenti varia da un minimo del 4% nel gruppo UCCELLI ACQUATICI ad un massimo dell'88% nella LEPRE. La bassa numerosità dei campioni di alcuni gruppi specie rende le stime molto

incerte. In figura 8 è riportata per ogni gruppo specie la distribuzione a posteriori della prevalenza di animali carrier di ceppi multi-resistenti e in tabella (7) le stime puntuali e i valori dell'intervallo di massima densità delle stime (95% High Probability Density HPD).

3.2.1 Associazione tra la prevalenza di animali carrier e caratteristiche ambientali

Il confronto tra modelli indagati basato sulle metriche della K-fold cross-validation (tabella8) ha permesso di selezionare come modello con le migliori performance in termini di predittività il modello:

$$\text{logit}(p) = \alpha_{\text{Comune}} + \beta_{\text{Specie}} + \beta_{\text{Pascolo}} + \beta_{\text{Urbanizzazione}} + \beta_{\text{Specie*Pascolo}}$$

Le stime dei coefficienti di regressione e gli intervalli di credibilità sono riassunti in tabella 9 e le rispettive distribuzioni a posteriori rappresentate in figura 9

Secondo il modello, la probabilità di un animale di essere un carrier di ceppi antibiotico resistenti di *Enterobacteriaceae* aumenta all'aumentare della superficie comunale (in ettari) dedicata al pascolo in misura differente a seconda del gruppo-specie di appartenenza (interazione tra specie e pascolo), come raffigurato in fig 10 dove la dipendenza della probabilità di Resistenza dalla superficie dedicata al pascolo per comune è riportata condizionalmente ai diversi gruppi-specie a cui appartiene il campione risultato carrier di ceppi resistenti.

3.3 Caratterizzazione fenotipica dell'antibiotico-resistenza degli isolati batterici

Le resistenze nei confronti di AMP e TET sono risultate le più frequenti: su 910 ceppi testati nei confronti di AMP 388 risultano resistenti (%), 342 ceppi risultano resistenti a TET (). Si osserva una frequenza di resistenza molto contenuta nei confronti degli altri antibiotici: solo l'8% di resistenze nei confronti di CFT, 5% nei confronti di COL, 5% nei confronti di ENR , 5% nei confronti di KAN e solo l'1.3% nei confronti di GEN. In tabella 10 per gli antibiotici del panel analizzato sono riportati le stime della prevalenza di resistenza con i rispettivi intervalli bayesiani di elevata densità (HPDI). In tabella 11 sono riportate le stime puntuali della prevalenza di ceppi resistenti ai diversi antibiotici suddivisi per il gruppo specie di provenienza. Escludendo i ceppi derivati da gruppi specie con ridotta dimensione del campione, la maggior frequenza di ceppi resistenti a AMP si osserva negli isolati del gruppo CORVIDI (58%), del gruppo CERVIDI (45%) e RAPACI (42%); le frequenze minori si osservano nel gruppo BOVIDI (26%) e SUIDI (22%). Le resistenze a TET sono risultate più frequenti nei ceppi isolati dai CORVIDI (51%) e RAPACI (48%), mentre le più basse in isolati da SUIDI (34%), CERVIDI(32%), BOVIDI(20%). Nei confronti della COLISTINA, antibiotico

di particolare interesse in ambito clinico umano, si osserva una bassa frequenza di ceppi resistenti da un minimo dello 0.5% osservato nei ceppi isolati dai SUIDI, ad un massimo del 16% osservato sia nei RAPACI che nella LEPRE. Anche per il CEFTIOFUR, cefalosporina di 3^a generazione nei confronti dei quali si è diffusa a livello mondiale la selezione di ceppi ESB^L, si osserva una bassa prevalenza di ceppi resistenti: minimo 2.1% negli UCCELLI ACQUATICI, massimo 24% nei RAPACI. La GEN risulta l'antibiotico verso cui gli isolati si sono mostrati in modo uniforme tra le differenti specie meno resistenti (12 ceppi 1.30%). Anche per ENR e KAN si osserva una bassa e uniforme prevalenza di ceppi resistenti tra i diversi gruppi specie. L'incertezza delle suddette stime sono rappresentate graficamente in figura 11. Il profilo di resistenza tra i differenti generi di ceppi isolati conferma che AMP e TET sono gli antibiotici verso i quali la maggior parte degli isolati mostra la maggior frequenza di resistenze (tabella 12).

3.3.1 Profili fenotipici di resistenza dei ceppi isolati e diversità ecologica

Complessivamente si osservano 39 differenti profili fenotipici basati sulle resistenze osservate. I profili più frequenti sono: TET-AMP (141 ceppi), AMP (130 ceppi), TET (85 ceppi), CFT-TET-AMP (27 ceppi), COL-TET-AMP (14 ceppi), COL-TET (12 ceppi) e CFT-TET (12 ceppi), che rappresentano più dell'80% dei ceppi. Il restante 20% è distribuito nei restanti 32 profili come rappresentato in figura 12. La distribuzione della frequenza ceppi in base al profilo di co-resistenza e la specie di fauna selvatica da cui provengono è rappresentata in figura 14. Si può osservare la "rarità" di molti profili presenti solo in determinati gruppi Specie. Si osserva una scarsa uniformità di profili tra i gruppi specie, con una particolare ricchezza di differenti profili nel gruppo CERVIDI e CORVIDI che sono i più rappresentati ma anche nei ceppi isolati dai RAPACI sebbene in numero sensibilmente più ridotto rispetto ai precedenti. Gli indici di diversità (tabella 13) sono riassunti in un grafico di Renyi entropy standardizzato (Fig.13). Nella popolazione di CERVIDI si osserva un profilo di dominanza in termini di diversità con una minore diversità di profili di co-resistenza con una forte dominanza di pochi profili. AL contrario i gruppi specie BOVIDI, SUIDI, CARNIVORI, LEPRE, UCCELLI ACQUATICI e ALRI VOLATILI, mostrano un profilo di uniformità (evenness), quindi caratterizzato da maggiore diversità senza la presenza di profili di co-resistenza relativamente dominanti. Le popolazioni di CORVIDI e RAPACI mostrano un profilo di diversità sovrapponibile e intermedio rispetto a quello di dominanza dei CERVIDI e di uniformità degli altri gruppi-specie.

3.3.2 Caratterizzazione genomica dei ceppi ceftiofur-resistenti

L'identificazione genomica dei 47 ceppi ceftiofur-resistenti ha permesso di identificare *Escherichia coli* nell'85% dei casi e *Escherichia fergusonii* nel 15%. Nei ceppi di *Escherichia coli* è emersa una prevalenza dell'10% (4/40) per il

gene TEM e del 2,50% (1/40) per SHV. Nei ceppi di *Escherichia fergusonii*, è stata riscontrata una prevalenza del 14,29% (1/7) per il gene SHV (tabella [14](#)).

3.4 Pool metagenomici

4 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'accumularsi di evidenza della presenza e diffusione nella fauna selvatica e in ambienti silvestri di ceppi batterici antimicrobico-resistenti ha portato molti Autori a ritenere che il problema AMR non è più e non solo confinato al comparto zootecnico e quello umano ma è un problema di sanità pubblica più vasto con un carattere ambientale che coinvolge il comparto uomo (uso/abuso degli antibiotici nella popolazione generale e in particolare in quella ospedalizzata), animali domestici (uso/abuso degli antibiotici negli allevamenti da reddito e in animali da compagnia) e ambiente selvatico sia con il coinvolgimento diretto della fauna selvatica che per contaminazione ambientale (Hassell et al. 2019; Carroll et al. 2015; Ramey and Ahlstrom 2020; Vittecoq et al. 2016). Come contributo al crescente interesse intorno al ruolo svolto dalla fauna selvatica nel mantenimento e diffusione dell'antibiotico resistenza, questo progetto di ricerca ha permesso di raccogliere dati su un ampio spettro di specie in un territorio con differenti gradi di antropomorfizzazione. Trattandosi di uno studio osservazionale, con un campionamento non probabilistico di convenienza, come la maggior parte degli studi effettuati sulla fauna selvatica (Bonnedahl and Jarhult 2014; Greig et al. 2015; Arnold, Williams, and Bennett 2016; Wang et al. 2017; Dolejska and Papagiannitsis 2018), soffre delle limitazioni derivanti principalmente dalle modalità non randomizzate di selezione del campione, che introduce nelle stime distorsioni derivanti da bias di selezione non prevedibili sia in termini quantitativi che direzionali. Le specie più rappresentate del campione esaminato appartengono al gruppo dei CERVIDI per i quali il piano di sorveglianza passivo CWD in atto ha comportato una maggiore attenzione da parte delle autorità sanitarie sul territorio nel recupero di carcasse da esaminare, e al gruppo CORVIDI anche in questo caso grazie all'attività di abbattimento selettivo operato nell'ambito del piano di sorveglianza della West Nile Disease. Il gruppo suidi è risultato sottocampionato rispetto all'atteso considerando la presenza di un piano di abbattimento e controllo sanitario obbligatorio. Carnivori e volatili differenti da Corvidi e Rapaci rappresentano una piccola frazione del campione e quindi poco adeguati a fornire adeguate informazioni sulla diffusione e mantenimento dell'antibiotico-resistenza. Anche la distribuzione geografica di provenienza dei campioni è risultata estremamente eterogenea se si guarda principalmente al comune di provenienza, ma come era atteso la maggior parte dei campioni proviene da un territorio a carattere prevalentemente montano e quindi tendenzialmente meno urbanizzato dei territori di pianura/collina. I campioni dei Corvidi fanno eccezione perché provengono per l'85% da territori non montani ad alta urbanizzazione, così come il 50% dei campioni di feci dei Rapaci.

A differenza degli studi pubblicati sull'argomento che, prevalentemente, focalizzano l'attenzione sul ceppo batterico, in questo progetto si è proceduto a quantificare anche la prevalenza di animali carrier di ceppi antibiotico-resistenti, definendo come "caso resistente", il campione di feci con almeno un ceppo risultato resistente ad almeno un antibiotico del panel testato e "caso multiresistente", il campione di feci con almeno un ceppo risultato resistente a tre o più antibiotici del panel testato. Indubbiamente questa definizione non protegge da bias di misclassificazione (presente comunque anche quando l'unità di osservazione è il ceppo batterico), ma siamo confidenti che il bias abbia una

direzionalità precisa e cioè comporti tendenzialmente una sottostima del numero di “casi” dovuta ad esempio al mancato isolamento di ceppi resistenti presenti nel campione di feci ma non isolati e processati per l’esame batteriologico. Da questo punto di vista quindi le stime di prevalenza di animali carrier sono sicuramente più ottimistiche della vera prevalenza e come tale vanno interpretate.

Se limitiamo le considerazioni ai gruppi-specie con una maggiore dimensione campionaria (CORVIDI, CERVIDI, BOVIDI e SUIDI), la prevalenza di casi resistenti più elevata la si riscontra nei CORVIDI (83%), seguiti dai CERVIDI(61%), SUIDI(56%) e infine i BOVIDI(37%), da cui si può notare come la prevalenza tendenzialmente diminuisce nelle specie i cui campioni provengono da ambienti meno antropomorfizzati. I campioni dei CORVIDI come indicato in precedenza provengono infatti da aree ad alta urbanizzazione dove, come analogamente a quanto già riportato in letteratura (Ramey and Ahlstrom 2020) per altre specie aviare onnivore (ad esempio Gabbiani) la frequentazione delle discariche per procurarsi il cibo rappresenterebbe il principale meccanismo espositivo in grado di determinare la cross-contaminazione ambiente-animale favorendo il mantenimento e la diffusione di ceppi e materiale genetico di resistenza. I campioni dei CERVIDI e SUIDI provengono da territori collinari/premontani, ma con un grado di urbanizzazione medio-bassa e quindi meno antropomorfizzati rispetto agli ambienti frequentati dai CORVIDI e quindi con minori occasioni di contaminazione ambientale con materiale di provenienza umana o da animali domestici. Infine i campioni dei BOVIDI provengono prevalentemente da ambienti totalmente montani con ridotta urbanizzazione. Il consumo di carcasse di animali domestici e/o animali peri-domestici come piccoli ratti e rettili, rappresenta un’altro meccanismo di contaminazione di animali selvatici ai resistomi antropogenici, come descritto da molte indagini focalizzate principalmente su specie aviare spazzine come il Capovaccaio (*Neophron percnopteurus*), l’Avvoltoio rosso (*Cathartes aura*) e il Grifone (*Gyps fulvus*) (Sulzner et al. 2014; Casas-Diaz et al. 2016; Blanco 2018). Analogo meccanismo espositivo può essere evocato per le Cornacchie (*Corvus corone*)-in quanto animali spazzini-, molto rappresentate in questo studio, per le specie di volatili del gruppo RAPACI esclusivamente carnivori in cui i livelli di prevalenza di animali carrier ceppi resistenti sono risultati alti 69% [95% HPD: 0.56%-0.81%], sebbene più incerti a causa della ridotta dimensione campionaria e per i mammiferi carnivori (volpi e tassi) in cui in questo studio è stata osservata un’elevata prevalenza di animali carrier di ceppi resistenti ma anche in questo caso la ridotta numerosità rende molto incerta la stima del 74% [95% HPD:55%-91%], comunque in accordo a quanto osservato da Jobbins and Alexander (2015), che quantificano la prevalenza di E.coli resistenti nei carnivori campionati al 62.5%. Va osservato però che sia per i RAPACI che per i mammiferi carnivori, sulla base dei dati osservati, la probabilità di ottenere stime di prevalenza più piccole del limite inferiore descritto dall’intervallo HPD non supera il 2.5%. L’associazione tra prevalenza di casi resistenti e area adibita al pascolo è condizionalmente dipendente dal gruppo specie considerato; risultato ragionevole dal punto di vista biologico perchè riflette la differente frequentazione delle differenti specie in aree con diverso grado di urbanizzazione (le aree adibite al pascolo tendono a essere presenti in aree a minore grado di urbanizzazione). Si

osserva comunque un aumentare della probabilità di osservare animali carrier di ceppi di *Enterobacteriaceae* resistenti ad almeno un antibiotico, in tutti i gruppi specie con diversa entità, fatta eccezione per il gruppo CORVIDI, in cui all'aumentare dell'area adibita a pascolo si osserva una riduzione del rischio di animali carrier.

Il trend di diminuzione della prevalenza di animali carrier di ceppi resistenti con la riduzione del grado di urbanizzazione si osserva anche nel caso di animali carrier di ceppi multi-resistenti. In questo caso la prevalenza è però sensibilmente più bassa (14% di casi multi-resistenti). Riteniamo questo un risultato interessante relativamente alla definizione del ruolo dei selvatici nel mantenimento dell'antibiotico-resistenza. Il fenomeno della multiresistenza è, difatti, la principale preoccupazione in sanità pubblica. I dati forniti da questo studio suggeriscono che, complessivamente, il fenomeno della multi-resistenza, almeno per quello che riguarda la sua manifestazione fenotipica, è poco frequente pari a circa il 14% (95% HPD:11%-16%) nelle specie e nei territori indagati. Nel gruppo CORVIDI, maggiormente esposto a contaminazione da ambienti antropomorfizzati è pari al 21% (95% HPD:15%-28%). Il fenomeno della multiresistenza è espressione della pressione selettiva determinata dall'uso/abuso degli antibiotici sia in medicina umana che veterinaria che si realizza principalmente attraverso meccanismi di coniugazione. Nel comparto selvatico, in assenza di utilizzo diretto di antibiotici ad uso terapeutico, è ragionevole supporre che il riscontro di ceppi batterici multiresistenti sia effetto principalmente di esposizione ad ambienti contaminati da batteri e/o materiale genetico carrier di geni di resistenza (resistoma ambientale). La bassa prevalenza osservata, soprattutto in CERVIDI, SUIDI e BOVIDI, suggerisce che i meccanismi di mantenimento nel comparto selvatico non sono sufficientemente adeguati a determinare livelli di diffusione elevati dei ceppi fenotipicamente multi-resistenti. Ricordiamo a questo proposito che il costo in fitness della resistenza è in genere molto alto e che quindi è ragionevole supporre che in assenza di continui stimoli selettivi determinati dall'uso di antibiotici in grado di attivare i geni di resistenza i batteri resistenti e multi-resistenti potrebbero limitare l'espansione clonale dei ceppi multi-resistenti nel comparto selvatico.

In questo studio la caratterizzazione microbiologica dei ceppi isolati mostra una netta prevalenza di *Escherichia coli* (67%), rispetto ad altre *Enterobacteriaceae*. Considerando che le modalità di campionamento delle colonie selezionate non garantiscono la rappresentatività degli isolati dai campioni di feci esaminati, in questo studio il focus è principalmente indirizzato alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* per quello che riguarda le manifestazioni fenotipiche delle resistenze al panel di antibiotici indagato. Fatta eccezione per lo studio di caratterizzazione genomica dei ceppi di *Escherichia coli* resistenti a Ceftiofur, e allo studio metagenomico che è stato eseguito solo su una selezione di ceppi di *Escherichia coli*. Focalizzando l'attenzione sui risultati dell'antibiotico-resistenza dei ceppi, il dato più rilevante è che la prevalenza delle resistenze è risultata più elevata solo in due classi di antibiotici: Ampicillina (43%) e Tetracicline (37%), mentre il restante 20% delle resistenti si distribuiscono tra le altre classi di antibiotici. Il profilo fenotipico più frequente tra i ceppi resistenti è il profilo TET-AMP con 141 ceppi, seguito da ceppi resistenti solo a AMP e solo TET. Pattern costantemente presente nei differenti gruppi-specie di provenienza dei campioni. Come già

ricordato in precedenza AMP è un antibiotico classificato come Critically Important e High Priority mentre la Tetraciclina è stata recentemente riclassificata, declassandola, come Highly Important in quanto antibiotico di elezione in casi di Brucellosi che almeno nei paesi sviluppati è stata quasi completamente eradicata. Si tratta di due antibiotici ampiamente utilizzati sia in medicina umana che veterinaria da circa mezzo secolo è ragionevole quindi supporre che i vari meccanismi di contaminazione ambientale di ceppi portatori di resistenza abbiano avuto il tempo di raggiungere aree meno antropomorfizzate aumentando la probabilità di esposizione della fauna selvatica al resistoma ambientale contaminante. Rilevante, da un punto di vista della sanità pubblica, la bassa prevalenza di ceppi resistenti ad antibiotici particolarmente importanti e sotto osservazione da parte del WHO tra cui la **Colistina** (5%), il **Ceftiofur**(9%) e l'**Enrofloxacin**(5%), in tutti i gruppi specie. I risultati ottenuti sono coerenti con gli altri studi pubblicati, e sebbene il confronto non sempre è possibile per differenti modalità di campionamento, specie campionate, antibiotici testati, si può osservare che gli antibiotici verso cui i ceppi di enterobatteriacee isolati mostrano maggiore resistenza sono principalmente quelli del gruppo delle β -lattamasi (Ampicillina, Amoxicillina, Amoxicillina-Ac.Clavulanico), Tetracicline e aminoglicosidi (Foti et al. 2018). Il fenomeno delle multi-resistenze, considerando il ceppo come unità di osservazione è ulteriormente ridimensionato, infatti solo il 10% dei ceppi mostra resistenza a tre o più antibiotici. Tra i pochi ceppi multiresistenti isolati i profili fenotipici più frequenti si caratterizzano dalla co-resistenza a **CFT-TET-AMP** osservato in 27 ceppi e **COL-TET-AMP** osservato in 14 ceppi. Altre combinazioni di co-resistenze risultano rare e molto disperse considerando che sono stati identificati 49 profili differenti di co-resistenza. La ridotta numerosità di questi fenotipi non permette di speculare sul loro significato biologico in merito alla diffusione e mantenimento dell'antibiotico-resistenza, nonostante queste limitazioni l'ampia variabilità intra-specie della frequenza di questi fenotipi è di un certo interesse in quanto offre una chiave di interpretazione a carattere ecologico che abbiamo cercato di affrontare attraverso lo studio della biodiversità nei differenti gruppi-specie. Questo approccio è già stato utilizzato da Mather et al. (2012) in un lavoro metodologico in cui è descritta l'applicazione di un nuovo approccio ecologico allo studio della biodiversità dei fenotipi antibiotico-resistenti al fine di indentificare le sorgenti di resistenza più probabili in popolazioni umane a animali a confronto. Un analogo approccio è stato quindi utilizzato anche da Hassell et al. (2019) mettendo a confronto la diversità dei fenotipi di resistenza di ceppi di *Escherichia coli* in popolazione di selvatici suburbani, animali domestici, esseri umani e ambiente. In questo studio la prevalenza di animali selvatici carrier di ceppi multi-resistenti è risultata molto elevata (52%) e variabile a seconda delle specie e delle abitudini alimentari. Il riscontro più interessante è rappresentato dal fatto che la diversità fenotipica dei ceppi isolati dalle specie selvatiche è risultata più bassa di quella osservata nei campioni di umani, di animali domestici e dell'ambiente. Secondo Hassell et al. (2019) questo risultato è consistente con l'ipotesi che i selvatici sono carrier passivi, recipienti (net sink), che fungono da canali di disseminazione ambientale piuttosto che una sorgente di resistenze. In sostanza la minore diversità fenotipica può essere attribuita a una minore presenza di geni di resistenza o in loro presenza all'assenza di stimoli selettivi (antibiotici, agenti chimici) in grado di attivare i geni ampliando quindi lo spettro fenotipico dei ceppi.

In questo progetto di ricerca mancano i dati relativi a ceppi provenienti dagli altri comparti (uomo, animali domestici e ambiente), quindi lo studio della diversità fenotipica si è limitata ad un confronto tra i fenotipi dei ceppi isolati dai diversi gruppo-specie indagati. Il gruppo CERVIDI mostra un profilo di bassa diversità, con la presenza di pochi fenotipi dominanti (questo gruppo si caratterizza per la frequenza più elevata di ceppi suscettibili a tutti gli antibiotici testati) , rispetto a tutti gli altri gruppi. CORVIDI E RAPACI condividono un profilo di diversità praticamente identico (le due curve si sovrappongono e quindi i due gruppi non possono essere ranghizzati) maggiore rispetto ai CERVIDI ma più basso rispetto agli altri gruppi che mostrano profili di maggiore uniformità (eveness) rispetto ai precedenti gruppi e un crescente profilo di diversità (in ordine crescente : SUIDI, BOVIDI, CARNIVORI, UCCELLI ACQUATICI, LEPRE E ALTRI VOLATILI Fig.13). Occorre sottolineare che trattandosi di profili empirici basati sulle proporzioni dei vari fenotipi di resistenza osservati, generalmente funzionano bene per grandi valori di ordine α (ad esempio $\alpha > 3$) perché queste misure sono determinate dai fenotipi dominanti, che appaiono sempre nei campioni, se la dimensione del campione non è irragionevolmente piccola. Tuttavia, per ordini bassi di α (specialmente per $0 \leq \alpha \leq 3$), i profili empirici tipicamente sottostimano i profili reali della popolazione a causa dell'effetto dei fenotipi non rilevate nei campioni - Chao and Jost (2015). Alla luce di queste considerazioni, i nostri risultati sulla diversità fenotipica, almeno per i gruppi specie LEPRE, ALTRI-VOLATILI, UCCELLI ACQUATICI, sono di scarsa utilità considerando la bassa dimensione campionaria e necessitano di ulteriori conferme attraverso studi di maggiori dimensioni. In assenza di stimoli selettivi , quali la somministrazione di antibiotici, la maggiore diversità fenotipica osservata nella maggior parte dei gruppi specie è verosimilmente imputabile a una contaminazione ambientale di ceppi multi-resistenti o geni di resistenza diversificata, a cui però , stante la bassa prevalenza di ceppi multi-resistenti generalmente osservata in tutti i gruppi-specie, non segue l'espansione clonale che potrebbe essere attesa in caso di costante stimolo selettivo indotto dall'assunzione di antibiotici.

4.1 Conclusioni

Analogamente alle considerazioni fatte in precedenza relativamente alle prevalenze di animali carrier di ceppi multi-resistenti, riteniamo che anche nel caso della prevalenza dei ceppi multiresistenti, i risultati di questo studio possono suggerire che la presenza di geni che codificano per fattori di resistenza non è sufficiente di per se a garantire un mantenimento di ceppi resistenti intra-specie o a caratterizzare i selvatici come specie serbatoio di resistomi in assenza di stimoli selettivi, cioè l'esposizione diretta ad agenti batterici, in grado di attivare questi geni. Da questo punto di vista l'ipotesi avanzata da molti autori che il comparto dei selvatici agisca come sentinella di contaminazione di resistomi ambientali è condivisibile e ben supportata dai riscontri osservazionali.

5 Raccomandazioni (max 2 pagine)

5.0.1 elementi gestionali e/o diagnostici

5.0.2 indicazioni per la ricerca

5.0.3 sugg per eventuali provvedimenti normativi

6 MODALITÀ DI DIVULGAZIONE DEI RISULTATI (1 pagina)

ELENCO FIGURE

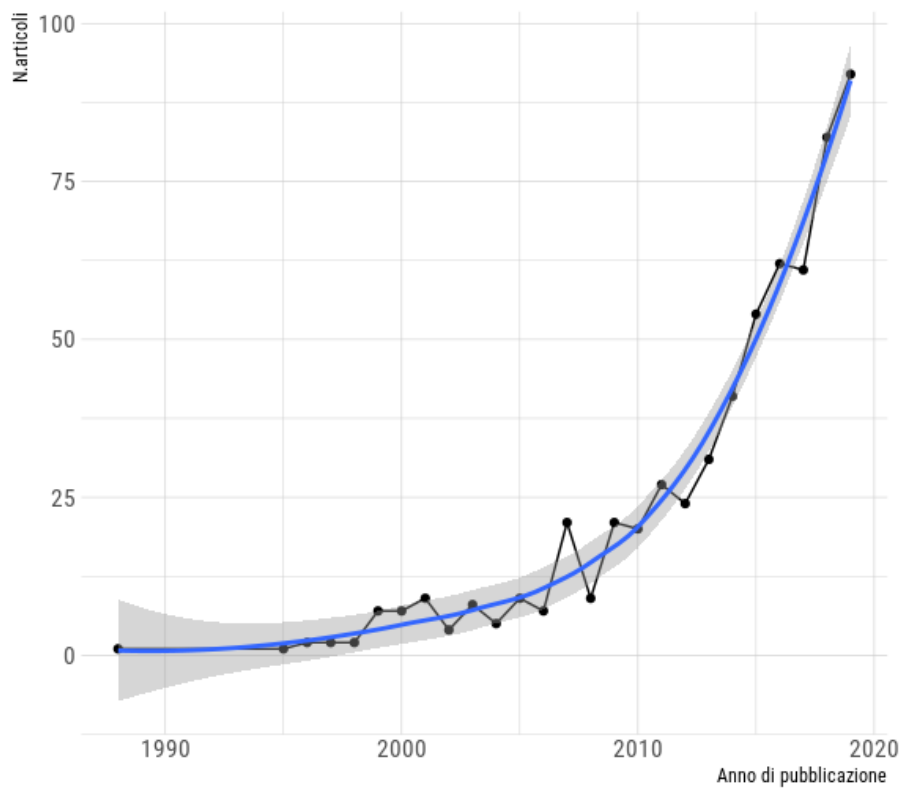


Figura 1: Andamento annuale del numero di pubblicazioni relative all'AMR nella fauna selvatica.



Figura 2: DDST-Test per l'identificazione fenotipica di ceppi ESBL produttori.



Figura 3: TDT-Test per l'identificazione fenotipica di ceppi ESBL produttori.

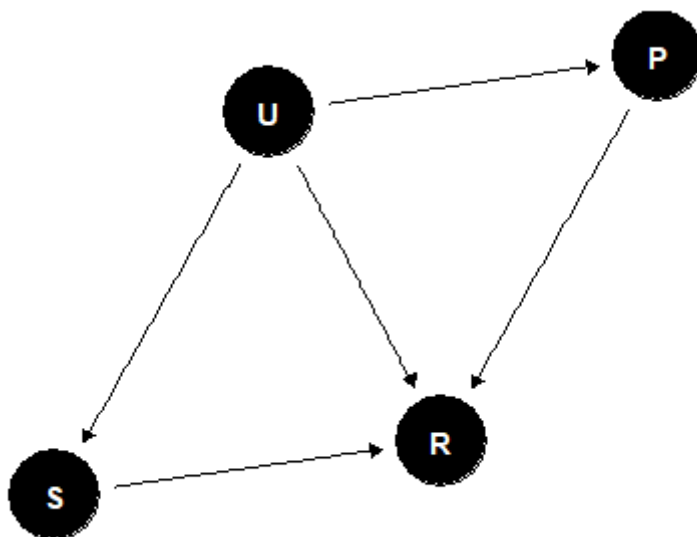


Figura 4: DAG-Direct Acyclic Graph: secondo il modello qui specificato, la probabilità di Resistenza è dipendente dalla Specie di provenienza dei campioni, dalla superficie del comune dedicata al Pascolo e dal grado di Urbanizzazione. Sia la Specie che frequenta un determinato comune sia il Pascolo sono dipendenti dal grado di Urbanizzazione. Specie e Pascolo sono indipendenti condizionalmente al grado di Urbanizzazione.

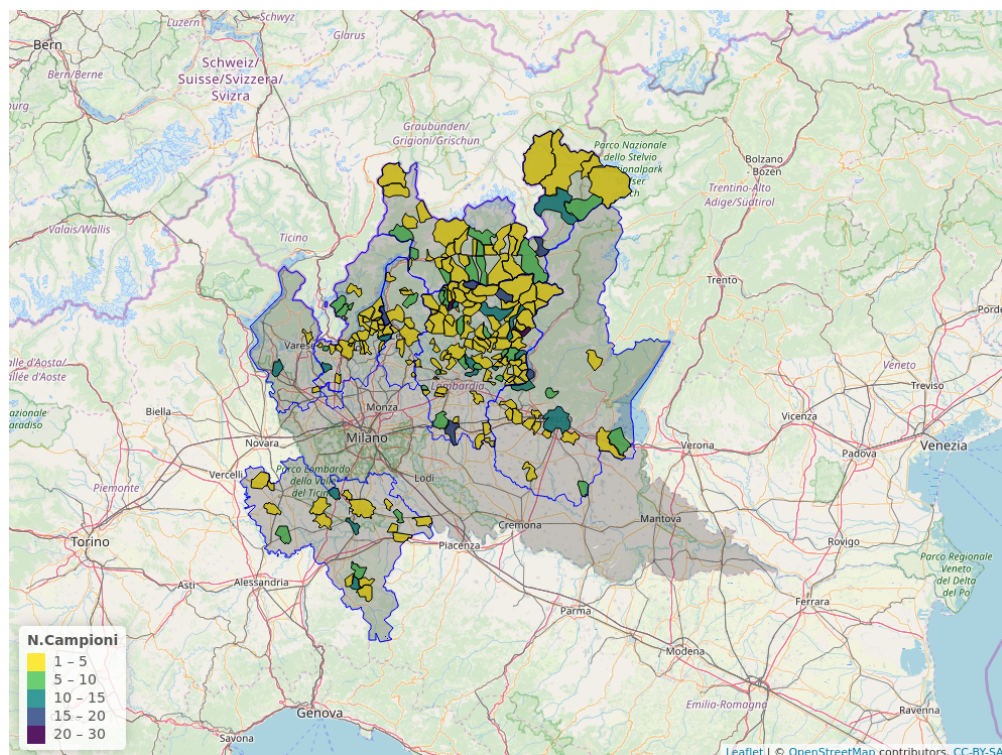


Figura 5: Comuni di provenienza dei campioni

ELENCO TABELLE

Tabella 1: Caratterizzazione territoriale e demografica dei comuni di provenienza dei campioni

Parametri	min	q25	median	q75	max	mean	sd
Superficie (Kmq)	1.97	10.6	17.1	29.4	227	29.8	44.0
Densità di popolazione (Ab/Kmq)	4.02	45.1	128.1	257.1	2210	250.0	356.9
Altitudine mediana	48.00	185.0	600.0	1120.0	2650	773.8	684.8
Superficie al pascolo (ettari)	0.09	11.0	60.0	170.9	2630	179.1	339.0
Aziende con pascolo	1.00	3.0	8.0	16.0	425	12.6	20.3
Capi al pascolo	2.00	52.0	133.0	293.0	8429	307.5	603.1

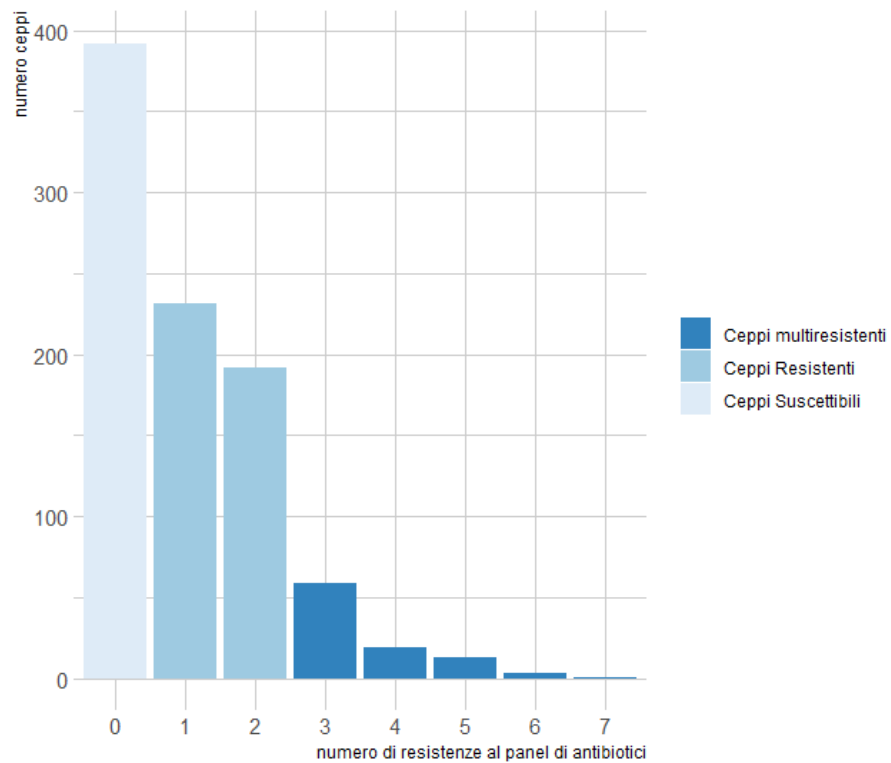


Figura 6: Distribuzione numero di resistenze al panel di antibiotici

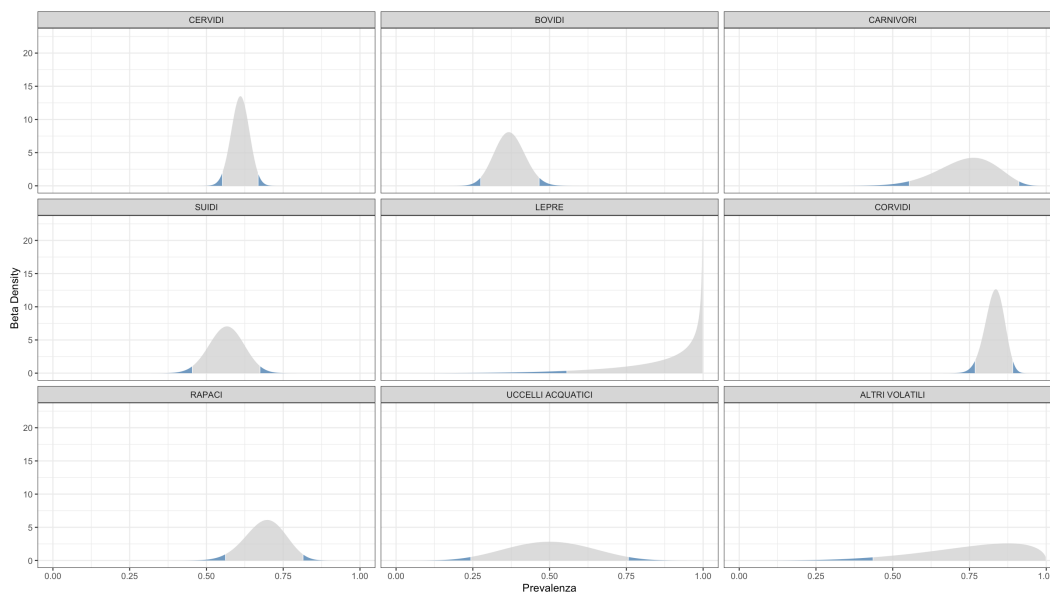


Figura 7: Distribuzione a posteriori delle stime di prevalenza di animali carrier di ceppi antibiotico-resistenti nei diversi gruppi-specie

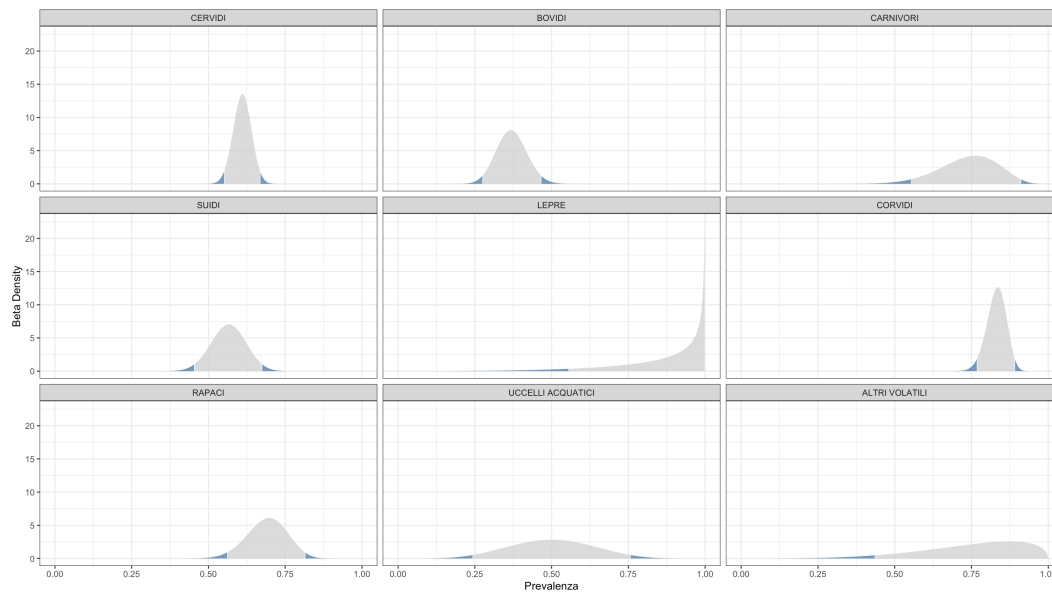


Figura 8: Distribuzione a posteriori delle stime di prevalenza di animali carrier di ceppi multi-resistenti nei diversi gruppi-specie

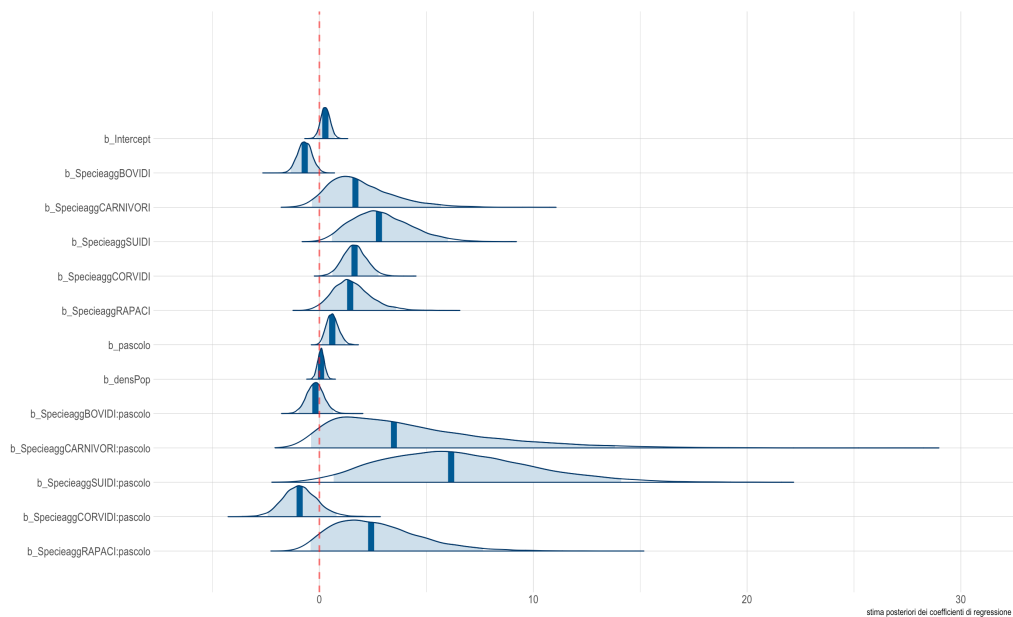


Figura 9: Distribuzione a posteriori delle stime dei coefficienti di regressione del modello 2

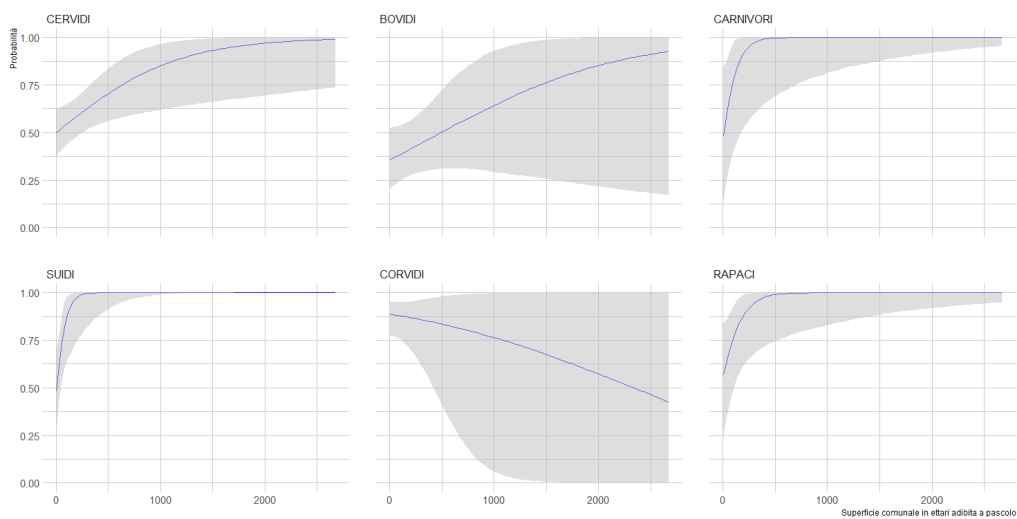


Figura 10: Stima dell'effetto 'Superficie adibita al pascolo' sulla probabilità di un animale di essere carrier di ceppi antibiotico-resistenti, condizionalmente al gruppo-specie di appartenenza

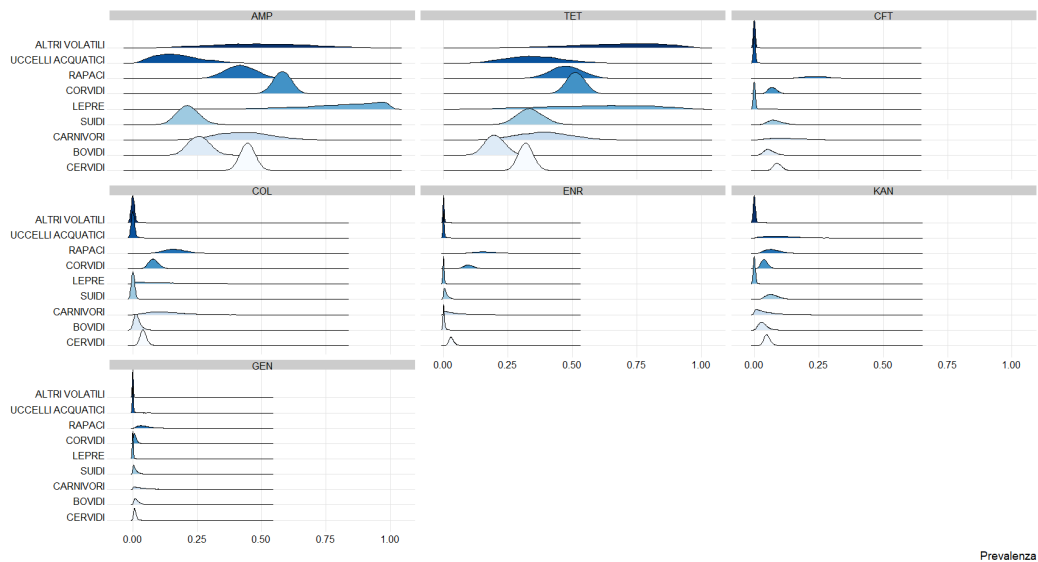


Figura 11: Distribuzione a posteriori delle stime di prevalenza di ceppi resistenti al panel di antibiotici nei differenti gruppi-specie

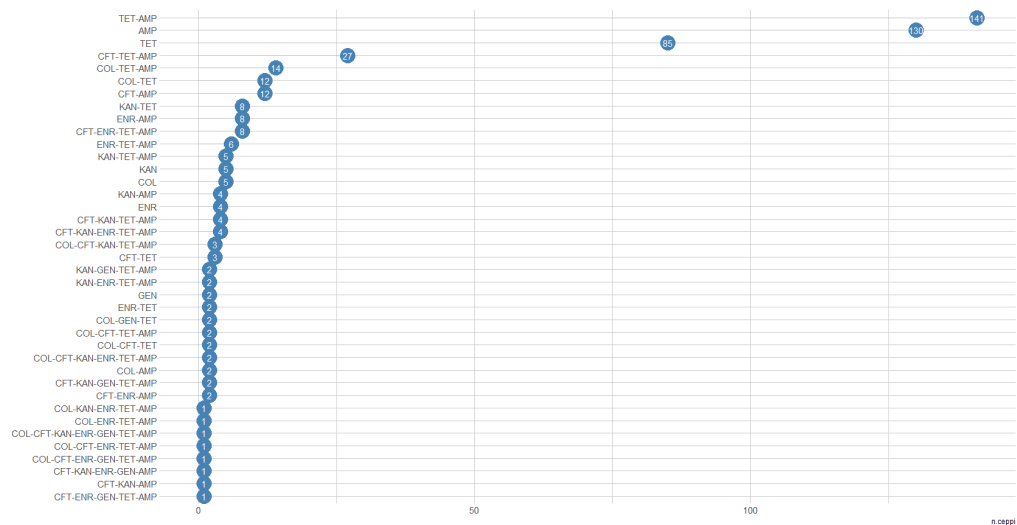


Figura 12: Distribuzione della frequenza dei differenti profili fenotipici di resistenza

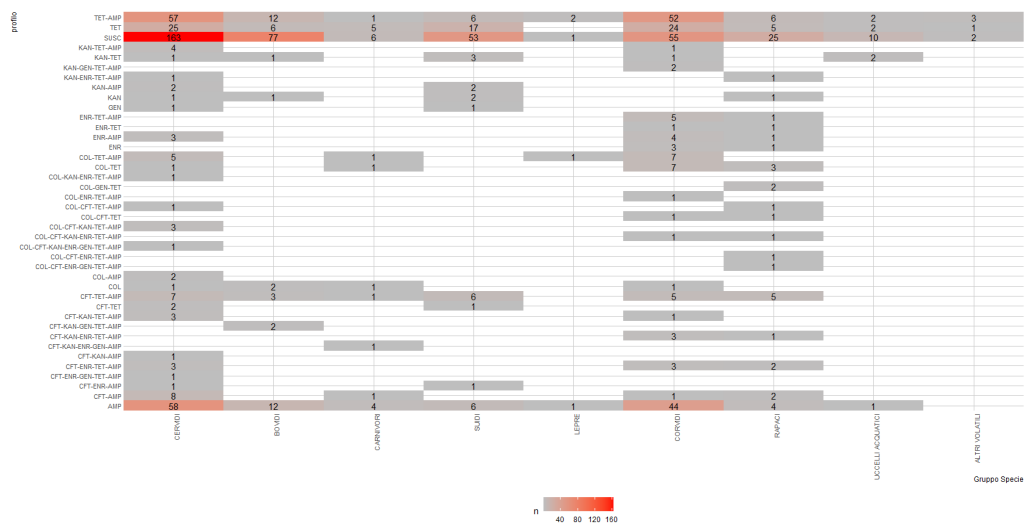


Figura 13: Distribuzione della frequenza di fenotipi di resistenza nei diversi gruppi specie

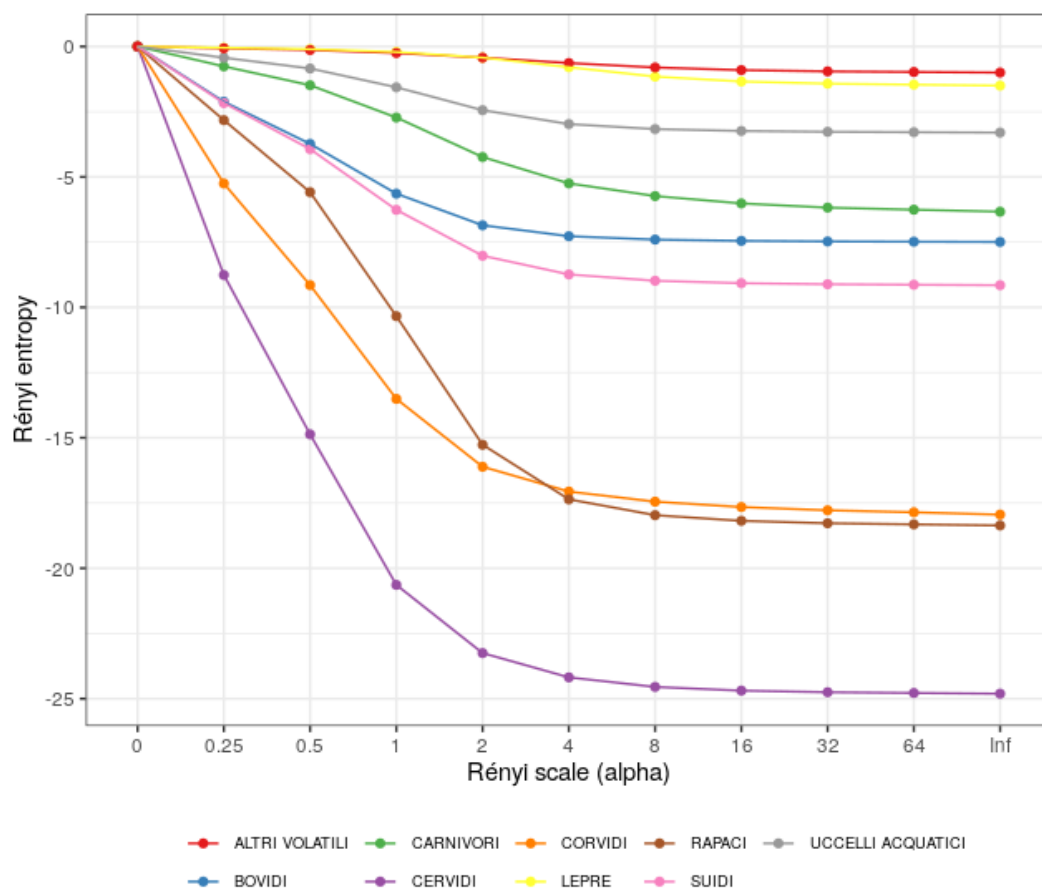


Figura 14: Profili di diversità dei fenotipi di ceppi resistenti nei diversi gruppi specie (Reny's entropy standardized)

Tabella 2: Distribuzione del numero di campioni di feci in base alle differenti specie di fauna selvatica di origine, raggruppati per il gruppo-specie di appartenenza

Gruppo	SPECIE	n	prop
CERVIDI	CAPRIOLO	191	28.51
CERVIDI	CERVO	80	11.94
CERVIDI	DAINO	1	0.15
BOVIDI	CAMOSCIO	46	6.87
BOVIDI	MUFLONE	43	6.42
BOVIDI	STAMBECCO	6	0.90
CARNIVORI	TASSO	4	0.60
CARNIVORI	VOLPE	16	2.39
SUIDI	CINGHIALE	76	11.34
LEPRE	LEPRE	3	0.45
CORVIDI	CORNACCHIA	122	18.21
CORVIDI	GAZZA	12	1.79
CORVIDI	GHIANDAIA	4	0.60
RAPACI	ALLOCCO	3	0.45
RAPACI	ASSIOLO	2	0.30
RAPACI	CIVETTA	10	1.49
RAPACI	CIVETTA NANA	1	0.15
RAPACI	FALCO PECCHIAIOLO	5	0.75
RAPACI	GHEPPIO	9	1.34
RAPACI	GUFO REALE	4	0.60
RAPACI	NIBBIO BRUNO	1	0.15
RAPACI	POIANA	3	0.45
RAPACI	SPARVIERO	11	1.64
UCCELLI ACQUATICI	CIGNO REALE	3	0.45
UCCELLI ACQUATICI	CORMORANO	1	0.15
UCCELLI ACQUATICI	FENICOTTERO	1	0.15

Tabella 2: Distribuzione del numero di campioni di feci in base alle differenti specie di fauna selvatica di origine, raggruppati per il gruppo-specie di appartenenza (*continued*)

Gruppo	SPECIE	n	prop
UCCELLI ACQUATICI	GABBIANO	1	0.15
UCCELLI ACQUATICI	GABBIANO REALE	1	0.15
UCCELLI ACQUATICI	GERMANO REALE	5	0.75
ALTRI VOLATILI	FAGIANO	3	0.45
ALTRI VOLATILI	PICCIONE	1	0.15
ALTRI VOLATILI	STARNA	1	0.15
Totale		670	100.00

Tabella 3: Distribuzione del numero di campioni di feci in base alle caratteristiche territoriali di provenienza per i differenti gruppo-specie di appartenenza (NM= Non Montani, P= Parzialmente Montani, T= Totalmente Montani)

Gruppo Specie	NM	P	T	Totale
CERVIDI	3	5	248	256
BOVIDI	0	4	88	92
CARNIVORI	5	0	15	20
SUIDI	3	1	68	72
LEPRE	1	0	2	3
CORVIDI	118	1	19	138
RAPACI	24	0	25	49
UCCELLI ACQUATICI	3	3	6	12
ALTRI VOLATILI	4	0	1	5
Totale	161	14	472	647

Tabella 4: Distribuzione del numero di campioni di feci in base al grado di urbanizzazione dei comuni di provenienza per i differenti gruppo-specie di appartenenza (UA= Urbanizzazione ALta, UM= Urbanizzazione Media, UB= Urbanizzazione Bassa)

Gruppo Specie	UA	UM	UB	Totale
CERVIDI	1	70	185	256
BOVIDI	4	19	69	92
CARNIVORI	0	6	14	20
SUIDI	0	24	48	72
LEPRE	0	1	2	3
CORVIDI	1	58	79	138
RAPACI	1	33	15	49
UCCELLI ACQUATICI	3	6	3	12
ALTRI VOLATILI	1	4	0	5
Total	11	221	415	647

Tabella 5: Distribuzione del numero e proporzione di ceppi della famiglia Enterobacteriaceae suddivise per genere, isolati dai 670 campioni di feci analizzati

Genere	n	prop(%)
E.coli	615	67.58
Klebsiella	61	6.70
Enterobacter	56	6.15
Serratia	40	4.40
Pantoea	39	4.29
Hafnia	36	3.96
Proteus	14	1.54
Acinetobacter	13	1.43

Tabella 5: Distribuzione del numero e proporzione di ceppi della famiglia Enterobacteriaceae suddivise per genere, isolati dai 670 campioni di feci analizzati (*continued*)

identificazione	n	prop(%)
Citrobacter	12	1.32
Yersinia	7	0.77
Cronobacter	6	0.66
Salmonella	5	0.55
Providencia	4	0.44
Pseudomonas	1	0.11
Shigella	1	0.11
Total	910	100.00

Tabella 14: Caratterizzazione genotipica dei geni di resistenza dei 47 ceppi resistenti a Ceftiofur

idceppo	gruppo filogenetico	CTX-M	SHV	CMY	TEM	MCR
1	A	N	N	N	N	N
2	A	N	N	N	N	N
3	F	N	N	N	N	N
4	A	N	N	N	N	N
5	F	N	N	N	N	N
6	E. fergusonii	N	N	N	N	N
7	A	N	N	N	P	N

Tabella 6: Stime della prevalenza di campioni resistenti suddivisi per gruppo-specie: R= numero di campioni resistenti, N= numero campioni esaminati, Prevalenza = media della distribuzione beta, inf-HPD= valore inferiore dell'intervallo HPD, sup-HPD = valore superiore dell'intervallo HPD

Gruppo Specie	R	N	Prevalenza	inf-HPD	sup-HPD
LEPRE	3	3	0.88	0.56	1.00
CORVIDI	115	138	0.83	0.77	0.89
ALTRI VOLATILI	4	5	0.75	0.44	1.00
CARNIVORI	15	20	0.74	0.55	0.91
RAPACI	34	49	0.69	0.56	0.81
CERVIDI	166	272	0.61	0.55	0.67
SUIDI	43	76	0.56	0.45	0.67
UCCELLI ACQUATICI	6	12	0.50	0.24	0.76
BOVIDI	35	95	0.37	0.27	0.47

Tabella 14: Caratterizzazione genotipica dei geni di resistenza dei 47 ceppi resistenti a Cefotiofur (*continued*)

ID Ceppo	Gruppo filogenetico	CTX-M	SHV	CMY	TEM	MCR
8	A	N	N	N	N	N
9	A	N	N	N	N	N
10	A	N	N	N	N	N
11	F	N	N	N	N	N
12	E. fergusonii	N	P	N	N	N
13	A	N	N	N	N	N
14	D	N	N	N	N	N
15	A	N	N	N	N	N
16	E. fergusonii	N	N	N	N	N
17	A	N	N	N	N	N
18	A	N	N	N	N	N
19	A	N	N	N	N	N
20	A	N	N	N	P	N
21	A	N	N	N	N	N
22	F	N	N	N	N	N
23	A	N	N	N	N	N
24	A	N	N	N	N	N
25	F	N	N	N	N	N
26	F	N	N	N	N	N
27	E. fergusonii	N	N	N	N	N
28	F	N	N	N	N	N
29	A	N	N	N	N	N
30	A	N	N	N	P	N
31	A	N	N	N	N	N
32	A	N	N	N	N	N
33	A	N	N	N	N	N
34	F	N	N	N	N	N
35	A	N	N	N	N	N
36	E. fergusonii	N	N	N	N	N

Tabella 14: Caratterizzazione genotipica dei geni di resistenza dei 47 ceppi resistenti a Ceftiofur (*continued*)

ID Ceppo	Gruppo filogenetico	CTX-M	SHV	CMY	TEM	MCR
37	A	N	N	N	N	N
38	A	N	P	N	N	N
39	A	N	N	N	N	N
40	B1	N	N	N	P	N
41	A	N	N	N	N	N
43	A	N	N	N	N	N
44	A	N	N	N	N	N
45	E	N	N	N	N	N
46	A	N	N	N	N	N
47	<i>E. fergusonii</i>	N	N	N	N	N
48	<i>E. fergusonii</i>	N	N	N	N	N

Tabella 7: Stime della prevalenza di campioni multi-resistenti suddivisi per gruppo-specie: MR= numero di campioni resistenti, N= numero campioni esaminati, Prevalenza = media della distribuzione beta, inf-HPD= valore inferiore dell'intervallo HPD, sup-HPD = valore superiore dell'intervallo HPD)

Specieagg	MR	N	Prevalenza	inf-HPD	sup-HPD
LEPRE	1	3	0.38	0.01	0.77
RAPACI	15	49	0.31	0.19	0.44
CORVIDI	29	138	0.21	0.15	0.28
CARNIVORI	3	20	0.17	0.03	0.32
CERVIDI	32	272	0.12	0.08	0.16
SUIDI	7	76	0.10	0.04	0.16
ALTRI VOLATILI	0	5	0.08	0.00	0.31
BOVIDI	5	95	0.06	0.02	0.10
UCCELLI ACQUATICI	0	12	0.04	0.00	0.15

Tabella 8: Confronto tra modelli mediante K-fold cross-validation

	elpd_diff	se_diff	elpd_kfold	se_elpd_kfold
mod2	0.0	0.0	-354	13
mod1	-2.3	5.5	-356	12
mod3	-17.6	5.2	-371	15

Tabella 9: Stime a posteriori dei parametri a effetto fisso del modello 2

Parametri	Mediana	CI_inf	CI_sup	PD	ROPE_(%)	Rhat	ESS
Intercept	0.28	-0.06	0.63	0.91	0.31	1	9547.70
Pascolo	0.60	0.16	1.06	0.99	0.05	1	8210.34
Urbanizzazione	0.08	-0.18	0.32	0.69	0.70	1	9657.94
Bovidi	-0.69	-1.23	-0.16	0.98	0.06	1	14802.64
Carnivori	1.69	-0.39	4.21	0.94	0.05	1	5027.61
Suidi	2.79	0.71	5.05	1.00	0.00	1	7060.33
Corvidi	1.64	0.79	2.52	1.00	0.00	1	8092.60
Rapaci	1.44	0.10	2.90	0.97	0.03	1	6864.94
Bovidi*Pascolo	-0.19	-0.84	0.45	0.68	0.32	1	12027.14
Carnivori*Pascolo	3.49	-0.72	9.57	0.95	0.03	1	4632.93
Suidi*Pascolo	6.16	1.03	11.83	0.99	0.00	1	7132.00
Corvidi*Pascolo	-0.92	-2.21	0.33	0.87	0.09	1	9445.26
Rapaci*Pascolo	2.42	-0.53	5.67	0.94	0.04	1	6025.29

Tabella 10: Stime bayesiane della prevalenza di ceppi resistenti ai differenti antibiotici

Antibiotico	R	N	Prevalenza	inf-HPD	sup-HPD
AMP	388	910	0.43	0.39	0.46
TET	342	910	0.38	0.34	0.41
CFT	77	910	0.09	0.07	0.10
COL	49	910	0.05	0.04	0.07
ENR	45	910	0.05	0.04	0.06
KAN	45	910	0.05	0.04	0.06
GEN	12	910	0.01	0.01	0.02

Tabella 11: Profilo di resistenza dei ceppi ai diversi antibiotici per gruppo-specie di provenienza del campione di feci

Specieagg	AMP	CFT	COL	ENR	GEN	KAN	TET
CERVIDI	0.45	0.09	0.04	0.03	0.01	0.05	0.32
BOVIDI	0.26	0.06	0.02	0.00	0.02	0.03	0.20
CARNIVORI	0.43	0.13	0.13	0.04	0.04	0.04	0.39
SUIDI	0.21	0.08	0.00	0.01	0.01	0.07	0.34
LEPRE	0.80	0.01	0.20	0.01	0.01	0.00	0.60
CORVIDI	0.58	0.07	0.08	0.10	0.01	0.04	0.51
RAPACI	0.42	0.24	0.17	0.16	0.05	0.07	0.48
UCCELLI ACQUATICI	0.18	0.00	0.00	0.00	0.00	0.12	0.35
ALTRI VOLATILI	0.50	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.67

Tabella 12: Profilo di antibiotico-resistenza tra i diversi generi dei ceppi isolati

Genere	N.ceppi	AMP	TET	CFT	COL	ENR	KAN	GEN
E.coli	615	32.52	34.96	9.43	2.93	4.07	6.50	1.30
Klebsiella	61	68.85	22.95	1.64	0.00	8.20	0.00	0.00
Enterobacter	56	87.50	67.86	0.00	7.14	5.36	1.79	1.79
Serratia	40	72.50	55.00	7.50	15.00	7.50	0.00	2.50
Pantoea	39	15.38	5.13	0.00	2.56	0.00	0.00	0.00
Hafnia	36	75.00	61.11	2.78	0.00	2.78	2.78	0.00
Proteus	14	14.29	100.00	21.43	100.00	0.00	7.14	14.29
Acinetobacter	13	84.62	23.08	76.92	7.69	30.77	0.00	0.00
Citrobacter	12	66.67	41.67	0.00	0.00	16.67	8.33	0.00
Yersinia	7	42.86	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Cronobacter	6	66.67	16.67	0.00	0.00	16.67	0.00	0.00
Salmonella	5	100.00	80.00	0.00	20.00	0.00	0.00	0.00
Providencia	4	0.00	25.00	0.00	100.00	0.00	0.00	0.00
Pseudomonas	1	100.00	100.00	100.00	0.00	100.00	100.00	0.00
Shigella	1	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Tabella 13: Valori di entropia di Renyi tra i diversi gruppi specie

	0	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	Inf
CERVIDI	27	18.24	12.13	6.36	3.75	2.81	2.45	2.31	2.25	2.22	2.19
BOVIDI	9	6.88	5.26	3.36	2.15	1.73	1.60	1.55	1.53	1.52	1.51
CARNIVORI	10	9.24	8.51	7.28	5.76	4.75	4.27	3.98	3.82	3.74	3.67
SUIDI	11	8.83	7.06	4.74	2.98	2.26	2.02	1.93	1.89	1.87	1.85
LEPRE	4	3.95	3.90	3.79	3.57	3.20	2.84	2.66	2.57	2.54	2.50
CORVIDI	22	16.75	12.85	8.49	5.89	4.94	4.55	4.35	4.22	4.14	4.05
RAPACI	21	18.18	15.41	10.66	5.73	3.64	3.03	2.82	2.72	2.68	2.64
UCCELLI ACQUATICI	5	4.57	4.16	3.44	2.56	2.03	1.83	1.76	1.73	1.71	1.70
ALTRI VOLATILI	3	2.93	2.87	2.75	2.57	2.36	2.20	2.09	2.05	2.02	2.00

7 Bibliografia

- Ahmed, Ashraf M, Yusuke Motoi, Maiko Sato, Akito Maruyama, Hitoshi Watanabe, Yukio Fukumoto, and Tadashi Shimamoto. 2007. "Zoo Animals as Reservoirs of Gram-Negative Bacteria Harboring Integrations and Antimicrobial Resistance Genes." *Applied and Environmental Microbiology* 73 (20): 6686–90.
- Allen, Heather K, Justin Donato, Helena Huimi Wang, Karen A Cloud-Hansen, Julian Davies, and Jo Handelsman. 2010. "Call of the Wild: Antibiotic Resistance Genes in Natural Environments." *Nature Reviews Microbiology* 8 (4): 251–59.
- Andersson, Dan I, and Diarmaid Hughes. 2010. "Antibiotic Resistance and Its Cost: Is It Possible to Reverse Resistance?" *Nature Reviews Microbiology* 8 (4): 260–71.
- Angulo, FJ, VN Nargund, and TC Chiller. 2004. "Evidence of an Association Between Use of Anti-Microbial Agents in Food Animals and Anti-Microbial Resistance Among Bacteria Isolated from Humans and the Human Health Consequences of Such Resistance." *Journal of Veterinary Medicine, Series B* 51 (8-9): 374–79.
- Arlet, Guillaume, Martine Rouveau, and Alain Philippon. 1997. "Substitution of Alanine for Aspartate at Position 179 in the Shv-6 Extended-Spectrum β -Lactamase." *FEMS Microbiology Letters* 152 (1): 163–67.
- Arnold, Kathryn E., Nicola J. Williams, and Malcolm Bennett. 2016. "'Disperse Abroad in the Land': The Role of Wildlife in the Dissemination of Antimicrobial Resistance." *BIOLOGY LETTERS* 12 (8). <https://doi.org/10.1098/rsbl.2016.0137>.
- Baker-Austin, Craig, Meredith S Wright, Ramunas Stepanauskas, and JV McArthur. 2006. "Co-Selection of Antibiotic and Metal Resistance." *Trends in Microbiology* 14 (4): 176–82.
- Blanco, Guillermo. 2018. "Supplementary Feeding as a Source of Multiresistant Salmonella in Endangered Egyptian Vultures." *TRANSBOUNDARY AND EMERGING DISEASES* 65 (3): 806–16. <https://doi.org/10.1111/tbed.12806>.
- Bonardi, Silvia, Clotilde Silvia Cabassi, Simona Longhi, Federico Pia, Margherita Corradi, Stefano Gilioli, and Erika Scaltriti. 2018. "Detection of Extended-Spectrum Beta-Lactamase Producing Escherichia Coli from Mesenteric Lymph Nodes of Wild Boars (Sus Scrofa)." *ITALIAN JOURNAL OF FOOD SAFETY* 7 (4): 213–16. <https://doi.org/10.4081/ijfs.2018.7707>.
- Bonnedahl, Jonas, and Josef D. Jarhult. 2014. "Antibiotic Resistance in Wild Birds." *UPSALA JOURNAL OF MEDICAL SCIENCES* 119 (2): 113–16. <https://doi.org/10.3109/03009734.2014.905663>.
- Bürkner, Paul-Christian. 2018. "Advanced Bayesian Multilevel Modeling with the R Package brms." *The R Journal* 10 (1): 395–411. <https://doi.org/10.32614/RJ-2018-017>.

- Camarda, Antonio, Elena Circella, Donato Pennelli, Anna Madio, Giordano Bruni, Vito Lagrasta, Giacomo Marzano, Egidio Mallia, and Evelyn Campagnari. 2006. "Wild Birds as Biological Indicators of Environmental Pollution: Biotyping and Antimicrobial Resistance Patterns of Escherichia Coli Isolated from Audouin's Gulls (*Larus Audouinii*) Living in the Bay of Gallipoli (Italy)." *ITALIAN JOURNAL OF ANIMAL SCIENCE* 5 (3): 287–90.
- Caprioli, A, G Donelli, V Falbo, C Passi, A Pagano, and A Mantovani. 1991. "Antimicrobial Resistance and Production of Toxins in Escherichia Coli Strains from Wild Ruminants and the Alpine Marmot." *Journal of Wildlife Diseases* 27 (2): 324–27.
- Carattoli, Alessandra. 2013. "Plasmids and the Spread of Resistance." *International Journal of Medical Microbiology* 303 (6-7): 298–304.
- Carroll, D., J. Wang, S. Fanning, and B. J. McMahon. 2015. "Antimicrobial Resistance in Wildlife: Implications for Public Health." *ZOO NOSES AND PUBLIC HEALTH* 62 (7): 534–42. <https://doi.org/10.1111/zph.12182>.
- Casas-Diaz, Encarna, Carles Cristofol, Rafaela Cuenca, Susana Agusti, Manuela Carneiro, Ignasi Marco, Santiago Lavin, and Antoni Margalida. 2016. "Determination of Fluoroquinolone Antibiotic Residues in the Plasma of Eurasian Griffon Vultures (*Gyps Fulvus*) in Spain." *Science of the Total Environment* 557: 620–26.
- Chang, Feng-Yee, LK Siu, Chang-Phone Fung, Min-Hua Huang, and Monto Ho. 2001. "Diversity of Shv and Tem β -Lactamases in Klebsiella Pneumoniae: Gene Evolution in Northern Taiwan and Two Novel β -Lactamases, Shv-25 and Shv-26." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45 (9): 2407–13.
- Chao, Anne, and Lou Jost. 2015. "Estimating Diversity and Entropy Profiles via Discovery Rates of New Species." *Methods in Ecology and Evolution* 6 (8): 873–82.
- Chopra, Ian, and Marilyn Roberts. 2001. "Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65 (2): 232–60.
- Clermont, Olivier, Julia K Christenson, Erick Denamur, and David M Gordon. 2013. "The c Lermont E Scherichia Coli Phylo-Typing Method Revisited: Improvement of Specificity and Detection of New Phylo-Groups." *Environmental Microbiology Reports* 5 (1): 58–65.
- Connell, Sean R, Dobryan M Tracz, Knud H Nierhaus, and Diane E Taylor. 2003. "Ribosomal Protection Proteins and Their Mechanism of Tetracycline Resistance." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47 (12): 3675–81.
- Cremet, L, N Caroff, S Dauvergne, A Reynaud, D Lepelletier, and S Corvec. 2011. "Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants in Esbl Enterobacteriaceae Clinical Isolates over a 1-Year Period in a French Hospital." *Pathologie Biologie* 59 (3): 151–56.

- Dierikx, Cindy, Alieda van Essen-Zandbergen, Kees Veldman, Hilde Smith, and Dik Mevius. 2010. "Increased Detection of Extended Spectrum Beta-Lactamase Producing Salmonella Enterica and Escherichia Coli Isolates from Poultry." *Veterinary Microbiology* 145 (3-4): 273–78.
- Dolejska, Monika, and Costas C. Papagiannitsis. 2018. "Plasmid-Mediated Resistance Is Going Wild." *PLASMID* 99 (September): 99–111. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2018.09.010>.
- Dorai-Raj, Sundar. 2014. *Binom: Binomial Confidence Intervals for Several Parameterizations*. <https://CRAN.R-project.org/package=binom>.
- Foti, Maria, Antonietta Mascetti, Vittorio Fisichella, Egidio Fulco, Bianca Maria Orlandella, and Francesco Lo Piccolo. 2017. "Antibiotic Resistance Assessment in Bacteria Isolated in Migratory Passeriformes Transiting Through the Metaponto Territory (Basilicata, Italy)." *AVIAN RESEARCH* 8 (October). <https://doi.org/10.1186/s40657-017-0085-2>.
- Foti, Maria, Donatella Rinaldo, Annalisa Guercio, Cristina Giacopello, Aurora Aleo, Filomena De Leo, Vittorio Fisichella, and Caterina Mammina. 2011. "Pathogenic Microorganisms Carried by Migratory Birds Passing Through the Territory of the Island of Ustica, Sicily (Italy)." *AVIAN PATHOLOGY* 40 (4): 405–9. <https://doi.org/10.1080/03079457.2011.588940>.
- Foti, Maria, Antonino Siclari, Antonietta Mascetti, and Vittorio Fisichella. 2018. "Study of the Spread of Antimicrobial-Resistant Enterobacteriaceae from Wild Mammals in the National Park of Aspromonte (Calabria, Italy)." *ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY AND PHARMACOLOGY* 63 (October): 69–73. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.08.016>.
- Gbonon, VM'bengue, SA Afran, KN Guessennd, AA Toty, TFB Diplo, ASP N'Guetta, and M Dosso. 2018. "Detection of Tem and Shv Genes in Clinical Escherichia Coli and Klebsiella Pneumoniae Strains Esbl Isolated in Neonatology and Pediatric Units." *Microbiology Research Journal International*, 1–7.
- Gelman, Andrew, Jennifer Hill, and Aki Vehtari. 2020. *Regression and Other Stories*. Cambridge University Press.
- Gelman, Andrew, Daniel Lee, and Jiqiang Guo. 2015. "Stan: A Probabilistic Programming Language for Bayesian Inference and Optimization." *Journal of Educational and Behavioral Statistics* 40 (5): 530–43.
- Giacopello, Cristina, Maria Foti, Antonietta Mascetti, Fabio Grosso, Deborah Ricciardi, Vittorio Fisichella, and Francesco Lo Piccolo. 2016. "Antimicrobial Resistance Patterns of Enterobacteriaceae in European Wild Bird Species Admitted in a Wildlife Rescue Centre." *VETERINARIA ITALIANA* 52 (2): 139–44. <https://doi.org/10.12834/VetIt.327.1374.2>.

- Greig, J., A. Rajic, I. Young, M. Mascarenhas, L. Waddell, and J. LeJeune. 2015. "A Scoping Review of the Role of Wildlife in the Transmission of Bacterial Pathogens and Antimicrobial Resistance to the Food Chain." *ZOOZOSES AND PUBLIC HEALTH* 62 (4): 269–84. <https://doi.org/10.1111/zph.12147>.
- Gullberg, Erik, Sha Cao, Otto G Berg, Carolina Ilbäck, Linus Sandegren, Diarmaid Hughes, and Dan I Andersson. 2011. "Selection of Resistant Bacteria at Very Low Antibiotic Concentrations." *PLoS Pathogens* 7 (7).
- Hassell, James M., Melissa J. Ward, Dishon Muloi, Judy M. Bettridge, Timothy P. Robinson, Sam Kariuki, Allan Ogendo, et al. 2019. "Clinically Relevant Antimicrobial Resistance at the Wildlife-Livestock-Human Interface in Nairobi: An Epidemiological Study." *LANCET PLANETARY HEALTH* 3 (6): E259–E269. <https://doi.org/10.17638/datacat.liverpool.ac.uk/729>.
- Irfan, Naik, Fomda Bashir, Tenguria Rajesh, M Phil, C Sikander, Peer Maroof, Nasir Reyaz, and others. 2013. "Phenotypic Detection of Extended-Spectrum and Ampc β Lactamases in Gram Negative Clinical Isolates from Tertiary Care Hospital." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, no. 33: 1537–41.
- Jobbins, Sarah Elizabeth, and Kathleen Ann Alexander. 2015. "FROM WHENCE THEY CAME-ANTIBIOTIC-RESISTANT ESCHERICHIA COLI IN AFRICAN WILDLIFE." *JOURNAL OF WILDLIFE DISEASES* 51 (4): 811–20. <https://doi.org/10.7589/2014-11-257>.
- Kindt, Roeland, and Richard Coe. 2005. *Tree Diversity Analysis: A Manual and Software for Common Statistical Methods for Ecological and Biodiversity Studies*. World Agroforestry Centre.
- Knapp, Charles W. 2013. "Patricia L. Keen and Mark Himmelford (Eds): Antimicrobial Resistance in the Environment." Springer.
- Kohanski, Michael A, Mark A DePristo, and James J Collins. 2010. "Sublethal Antibiotic Treatment Leads to Multidrug Resistance via Radical-Induced Mutagenesis." *Molecular Cell* 37 (3): 311–20.
- Luo, Naidan, Sonia Pereira, Orhan Sahin, Jun Lin, Shouxiong Huang, Linda Michel, and Qijing Zhang. 2005. "Enhanced in Vivo Fitness of Fluoroquinolone-Resistant *Campylobacter* Jejuni in the Absence of Antibiotic Selection Pressure." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (3): 541–46.
- Mabilat, Claude, Sylvie Goussard, Wladimir Sougakoff, Robert C Spencer, and Patrice Courvalin. 1990. "Direct Sequencing of the Amplified Structural Gene and Promoter for the Extended-Broad-Spectrum β -Lactamase Tem-9 (Rhh-1) of *Klebsiella Pneumoniae*." *Plasmid* 23 (1): 27–34.
- Makowski, Dominique, Mattan S Ben-Shachar, SH Chen, and Daniel Lüdtke. 2019. "Indices of Effect Existence and Significance in the Bayesian Framework." *Frontiers in Psychology* 10: 2767.

- Mather, Alison E, Louise Matthews, Dominic J Mellor, Richard Reeve, Matthew J Denwood, Patrick Boerlin, Richard J Reid-Smith, et al. 2012. “An Ecological Approach to Assessing the Epidemiology of Antimicrobial Resistance in Animal and Human Populations.” *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 279 (1733): 1630–9.
- Organization, World Health, and others. 2019. “Critically Important Antimicrobials for Human Medicine.”
- Pagano, A, G Nardi, C Bonaccorso, V Falbo, C Passi, V Sanguinetti, and A Mantovani. 1985. “Faecal Bacteria of Wild Ruminants and the Alpine Marmot.” *Veterinary Research Communications* 9 (1): 227–32.
- Philippon, A, S Ben Redjeb, A Ben Hassen, and G Fournier. 1989. “Epidemiology of Extended Spectrum β -Lactamases.” *Infection* 17 (5): 347–54.
- Ramey, Andrew M., and Christina A. Ahlstrom. 2020. “ANTIBIOTIC RESISTANT BACTERIA IN WILDLIFE: PERSPECTIVES ON TRENDS, ACQUISITION AND DISSEMINATION, DATA GAPS, AND FUTURE DIRECTIONS.” *JOURNAL OF WILDLIFE DISEASES* 56 (1): 1–15. <https://doi.org/10.7589/2019-04-099>.
- R Core Team. 2020. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>.
- Rebelo, Ana Rita, Valeria Bortolaia, Jette S Kjeldgaard, Susanne K Pedersen, Pimlapas Leekitcharoenphon, Inge M Hansen, Beatriz Guerra, et al. 2018. “Multiplex Pcr for Detection of Plasmid-Mediated Colistin Resistance Determinants, Mcr-1, Mcr-2, Mcr-3, Mcr-4 and Mcr-5 for Surveillance Purposes.” *Eurosurveillance* 23 (6): 17–00672.
- Robinson, Timothy P, DP Bu, Juan Carrique-Mas, Eric M Fèvre, Marius Gilbert, Delia Grace, Simon I Hay, et al. 2016. “Antibiotic Resistance Is the Quintessential One Health Issue.” *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 110 (7): 377–80.
- Stan Development Team. 2020. “RStan: The R Interface to Stan.” <http://mc-stan.org/>.
- Sulzner, Kate, Terra Kelly, Woutrina Smith, and Christine K. Johnson. 2014. “ENTERIC PATHOGENS AND ANTIMICROBIAL RESISTANCE IN TURKEY VULTURES (CATHARTES AURA) FEEDING AT THE WILDLIFE-LIVESTOCK INTERFACE.” *JOURNAL OF ZOO AND WILDLIFE MEDICINE* 45 (4): 931–34. <https://doi.org/10.1638/2012-0217.1>.
- Turchi, Barbara, Marta Dec, Fabrizio Bertelloni, Stanislaw Winiarczyk, Sebastian Gnat, Flavio Bresciani, Fabio Viviani, Domenico Cerri, and Filippo Fratini. 2019. “Antibiotic Susceptibility and Virulence Factors in Escherichia Coli from Sympatric Wildlife of the Apuan Alps Regional Park (Tuscany, Italy).” *MICROBIAL DRUG RESISTANCE* 25 (5): 772–80. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0191>.

- Vittecoq, Marion, Sylvain Godreuil, Franck Prugnotte, Patrick Durand, Lionel Brazier, Nicolas Renaud, Audrey Arnal, et al. 2016. "Antimicrobial Resistance in Wildlife." *JOURNAL OF APPLIED ECOLOGY* 53 (2): 519–29. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12596>.
- Vo, An TT, Engeline van Duijkeren, Ad C Fluit, and Wim Gaastra. 2007. "Characteristics of Extended-Spectrum Cephalosporin-Resistant *Escherichia Coli* and *Klebsiella Pneumoniae* Isolates from Horses." *Veterinary Microbiology* 124 (3-4): 248–55.
- Wang, Jing, Zhen-Bao Ma, Zhen-Ling Zeng, Xue-Wen Yang, Ying Huang, and Jian-Hua Liu. 2017. "The Role of Wildlife (Wild Birds) in the Global Transmission of Antimicrobial Resistance Genes." *ZOOLOGICAL RESEARCH* 38 (2): 55–80. <https://doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2017.003>.
- Woodford, Neil, Elizabeth J Fagan, and Matthew J Ellington. 2006. "Multiplex Pcr for Rapid Detection of Genes Encoding Ctx-M Extended-Spectrum β -Lactamases." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 57 (1): 154–55.

8 Allegato

Analisi metagenomiche (Responsabile scientifico Dr. Stefano Pongolini- U.O.2)

Materiali e metodi

I pool di isolati sui quali sono state applicate tecniche di metagenomica shotgun sono stati allestiti in modo da valutare eventuali differenze nel corredo di geni di antibioresistenza in *Escherichia coli* tra gruppi-specie di ospiti differenti e, all'interno dello stesso gruppo-specie, tra aree differenti corrispondenti alle province di Bergamo e Sondrio e a livelli altitudinali differenti all'interno della stessa provincia. In particolare, gli isolati di *Escherichia coli* ottenuti da campioni di feci di CERVIDI nella provincia di Bergamo sono stati divisi in tre pool corrispondenti alle prealpi bergamasche (Pool 1), la Val Brembana (Pool 2) e le Valli Seriana e Borlezza (Pool 3). Gli isolati di *Escherichia coli* da feci di CERVIDI nella provincia di Sondrio sono stati divisi in due pool corrispondenti alla media valle (Pool 4) e l'alta valle (Pool 5). I pool per gli isolati di *Escherichia coli* da feci da altri gruppi di ospiti sono stati suddivisi tra SUIDI (Pool 6), CORVIDI (Pool 7), BOVIDI (Pool 8) e RAPACI (Pool 9).

In aggiunta ai pool già descritti per valutare i profili di geni di resistenza in *Escherichia coli* nei selvatici è stato inserito un ulteriore pool (Pool 10) per ricercare i geni di resistenza in *Klebsiella pneumoniae* in considerazione della particolare importanza nella clinica umana e nelle problematiche di antibiotico-resistenza nosocomiali. Quest'ultimo pool è composto da isolati ottenuti da feci di CORVIDI (13 isolati), RAPACI (4 isolati), CERVIDI (2 isolati) e LEPRI (1 isolato).

Il numero massimo di isolati per pool è stato scelto sulla base di prove preliminari con un ceppo a resistenze note in cui si è valutata la quantità di dato necessaria per avere una buona copertura dei geni di antibiotico resistenza ($>10x$), soglia al di sopra della quale il centro di referenza europeo per l'antibiotico resistenza del DTU riporta di poter rintracciare con buona confidenza tutti i geni di resistenza presenti (Valeria Bertolaia, comunicazione personale).

Tabella 1: Composizione dei pool di ceppi utilizzati per l'analisi metagenomica

POOL	Specie animale origine	Specie batterica isolata	n.isolati
1	CERVIDI	Escherichia coli	50
2	CERVIDI	Escherichia coli	50
3	CERVIDI	Escherichia coli	31
4	CERVIDI	Escherichia coli	50
5	CERVIDI	Escherichia coli	35
6	SUIDI	Escherichia coli	50
7	CORVIDI	Escherichia coli	50
8	BOVIDI	Escherichia coli	50
9	RAPACI	Escherichia coli	50
10	CERVIDI, RAPACI, CORVIDI, LEPRE	Klebsiella pneumoniae	20

I pool degli isolati selezionati sono stati preparati come indicato nei punti sottostanti:

1. preincubazione dei singoli isolati in 3 ml di terreno liquido BHI (Brain Heart Infusion) overnight come verifica di sterilità;
2. dopo 24h, allestimento delle brodo colture per l'estrazione del DNA in 3 ml di terreno liquido BHI (Brain Heart Infusion) overnight;
3. dopo 24h e non oltre, sono stati prelevati 100 μ L di brodocoltura per ciascun isolato e inseriti nella provetta di pool prelevando solo le brodoculture normalmente sviluppate (fase stazionaria), per evitare di alterare il bilanciamento del pool nel caso di crescita non adeguate;
4. miscelamento accurato del pool mediante vortex e trasferimento del pool al laboratorio di sequenziamento in giornata per evitare degradazione del materiale e risultati non affidabili.

Sequenziamento genomico

Il DNA genomico è stato estratto mediante il kit DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) a partire da 1 ml di brodocoltura di ciascun pool di isolati seguendo il protocollo della ditta produttrice per l'estrazione del DNA genomico di batteri gram negativi.

Il DNA estratto è stato quantificato mediante sistema fluorimetrico Quantus (Promega), mentre la purezza del DNA è stata valutata mediante sistema spettrofotometrico Synergy (Biotek) considerando processabili i DNA dei pool con rapporto dell'assorbanza a 260 e 280 nm ($A_{260/280}$) compreso tra 1.8 e 2.2.

Partendo dal DNA estratto sono state preparate librerie genomiche utilizzando il kit Nextera XT Flex DNA e le librerie preparate sono state corse mediante sistema Miseq (Illumina) con cartuccia MiSeq Reagent Kit v2 (500 cycles) per la generazione di paired-end 2x250bp reads.

Le reads grezze prodotte dal sequenziatore sono state valutate sulla base di criteri di qualità della sequenza mediante FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Le reads sono state successivamente filtrate per qualità (rimozione di basi iniziali e finali con PHRED <20 considerando finestre di basi di 20 nt con PHRED medio <20) e lunghezza (reads con lunghezza > 50 bp) mediante il software Trimmomatic (Bolger A. et al, 2014)

Le reads filtrate sono state poi utilizzate come input per l'individuazione di geni conferenti antibiotico resistenza utilizzando il database Resfinder ver. 4.0 (Bortolaia V. et al.2020) usando i parametri di default (80% di identità su 60% di lunghezza di un gene target). Tra gli output dell'analisi sono stati considerati e comparati i geni presenti in ciascun pool di campioni associati alle principali classi di antibiotici (Aminoglicosidi, Beta lattamici, Colistina, Fluorochinoloni, Fosfomicina, Acido Fusico, Glicopeptidi, Macrolidi, Lincosamina, Streptomicina A, Nitroimidazolo, Fenicolo, Oxazolidinone, Rifampicina, Sulfonamide, Tetraciclina, Trimetoprim) ed i profili di resistenza in-silico per gli antibiotici considerati.

Risultati

Estrazione del DNA genomico

Il DNA genomico dei 10 pool analizzati è stato estratto con rese non elevate ma sufficienti per la preparazione delle librerie genomiche (tabella 2). La purezza del DNA è risultata adeguata in tutti i campioni tranne che nel campione n. 11 che perciò non è risultato processabile.

Tabella 2: Elenco dei pool analizzati e relative quantità di DNA genomico estratto.

POOL	Quantificazione (ng/ul)	Rapporto 260/280
1	19.0	2.15
2	12.0	2.10
3	15.0	2.13
4	14.0	2.16
5	7.3	2.13
6	24.0	2.19
7	46.0	2.18
8	13.0	2.19
9	14.0	2.18
10	12.0	2.16
11	6.4	3.14

SEQUENZIAMENTO GENOMICO: Preparazione del DNA genomico, delle librerie genomiche, reazione di sequenziamento ed analisi bioinformatiche

La corsa di sequenziamento in Miseq dei pool di isolati selezionati hanno generato le quantità di dato indicate in tabella 3. La quantità di dato per ogni pool è accettabile poiché produce un coverage medio per isolato >10, soglia al di sopra della quale si è dimostrato di poter rintracciare tutti i geni AMR presenti grazie a prove preliminari a diverse profondità con un ceppo a resistenze note e ad un confronto con gli esperti AMR del DTU (centro di referenza europeo per l'antibiotico resistenza); rimane tuttavia un piccolo sbilanciamento del coverage di alcuni pool che risultano a basso coverage (pool n.7 e 9) mentre altri hanno coverage più elevati (35-36X, pool n. 5 e 6). Il coverage medio delle corse risulta essere di 28X. Tale copertura di sequenziamento e la bontà della qualità dei dati genomici valutata con FastQC ha permesso l'identificazione dei geni di antibiotico-resistenza con sufficiente profondità e precisione.

Tabella 3: Numero di reads e coverage per ciascun pool sequenziato.

POOL	N.isolati	R1	R2	R3	Cov
1	50	28336544	27250964	545019	27
2	50	26719066	25451148	509023	25
3	31	22532802	21984142	709166	35
4	49	29934864	28806258	587883	29
5	35	27035084	24895484	711300	36
6	47	33658626	32615470	693946	35
7	45	14550964	13832892	307398	15
8	49	29133736	28498164	581595	29
9	47	15552662	13859472	294882	15
10	20	13250594	12846328	642316	32

^{R1} N.totali reads

^{R2} N.totali reads filtrate (bp)

^{R3} N.reads totali filtrate/isolato (bp)

^{Cov} Coverage medio/isolato (X)

Dal momento che nelle analisi non è possibile associare un profilo di resistenza/sensibilità ad un antibiotico per un singolo isolato dato che si tratta di una valutazione di un pool di isolati è stata considerata la presenza/assenza in-silico di geni AMR per gli antibiotici considerati in ciascun pool di isolati. Tale valutazione qualitativa è stata effettuata partendo dal dettaglio di identificazione dei singoli geni AMR individuati (fig 1)

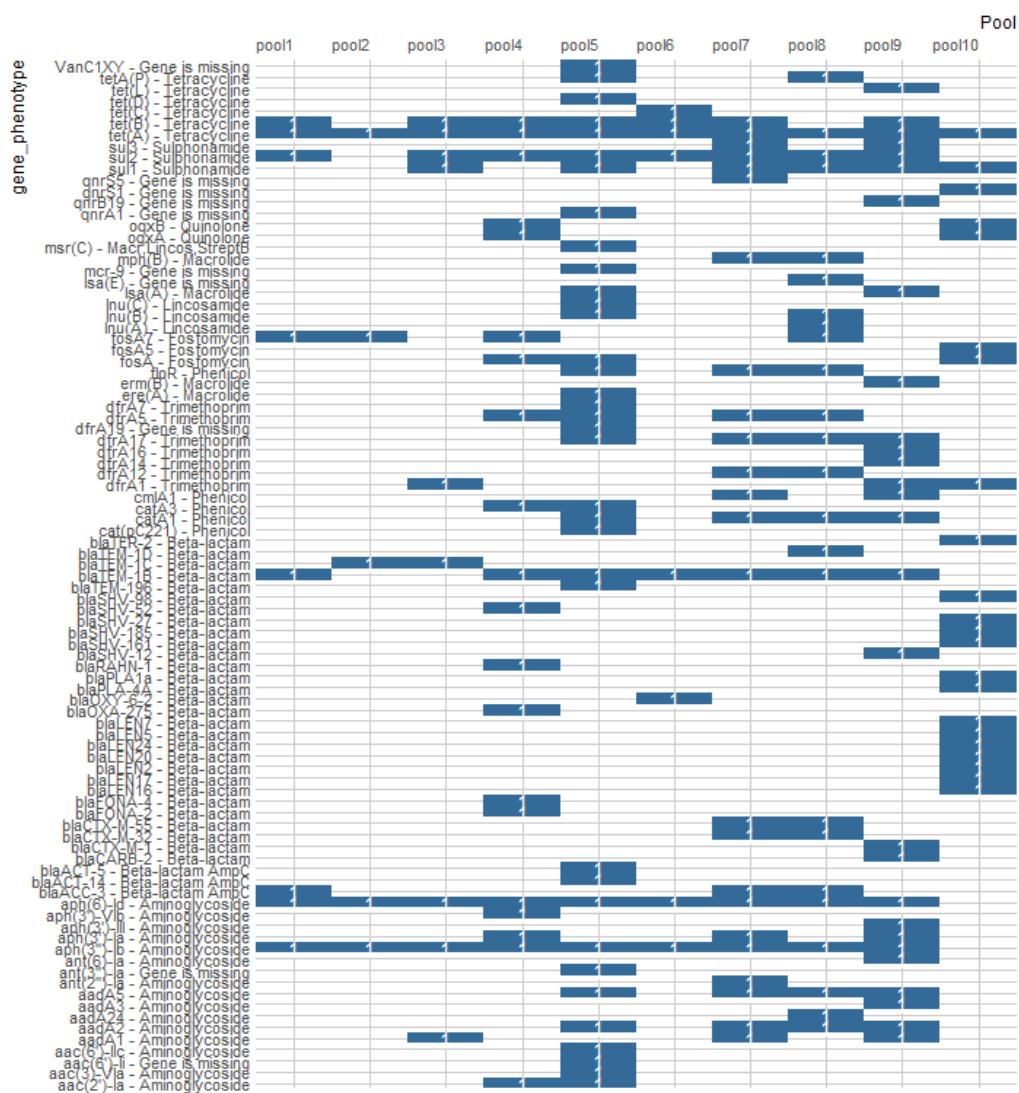


Fig.1: Geni AMR individuati nei pool- Per ogni gene AMR individuato nell'analisi metagenomica (AMR gene) viene riportata la classe di antimicrobici associata (Phenotype) e la presenza/assenza del gene in ogni pool

mentre una valutazione quantitativa è stata effettuata sul n. di geni AMR totali presenti in ciascun pool e per ciascun antibiomicrobico (fig.2)



Fig.2: Analisi quantitativa del n. di geni AMR per antibiotico nei pool analizzati

e per ciascuna classe di antimicrobici (fig.3)

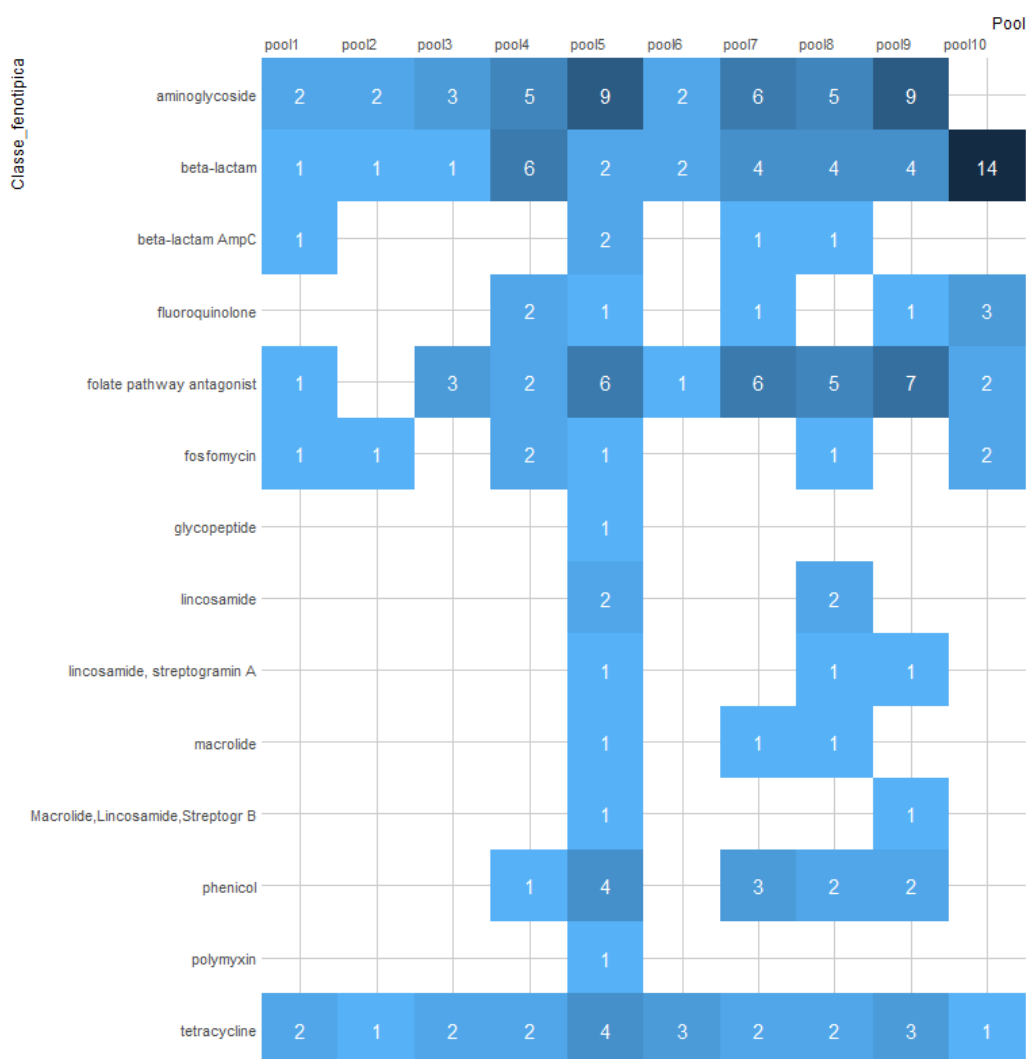
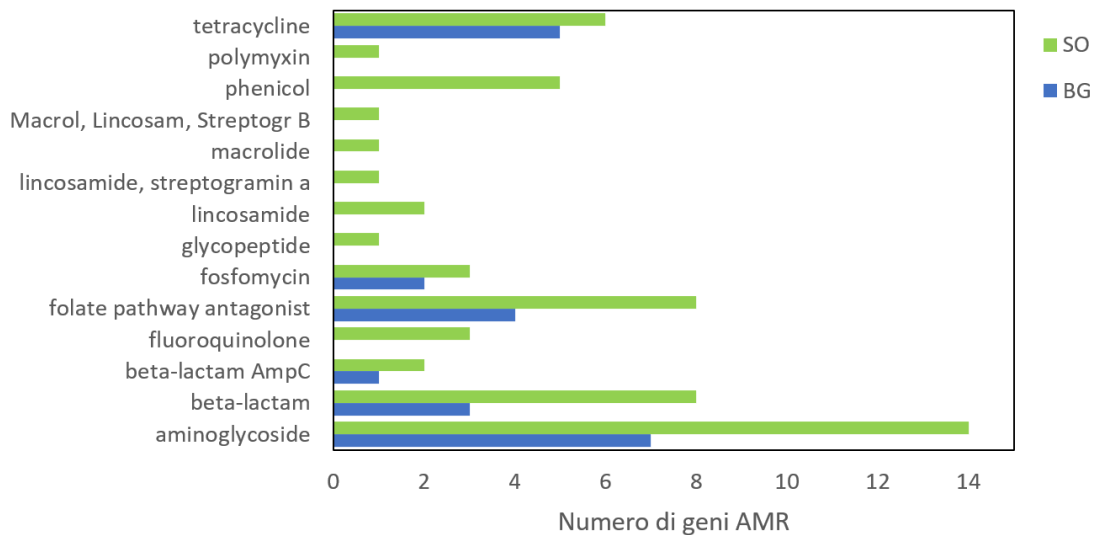


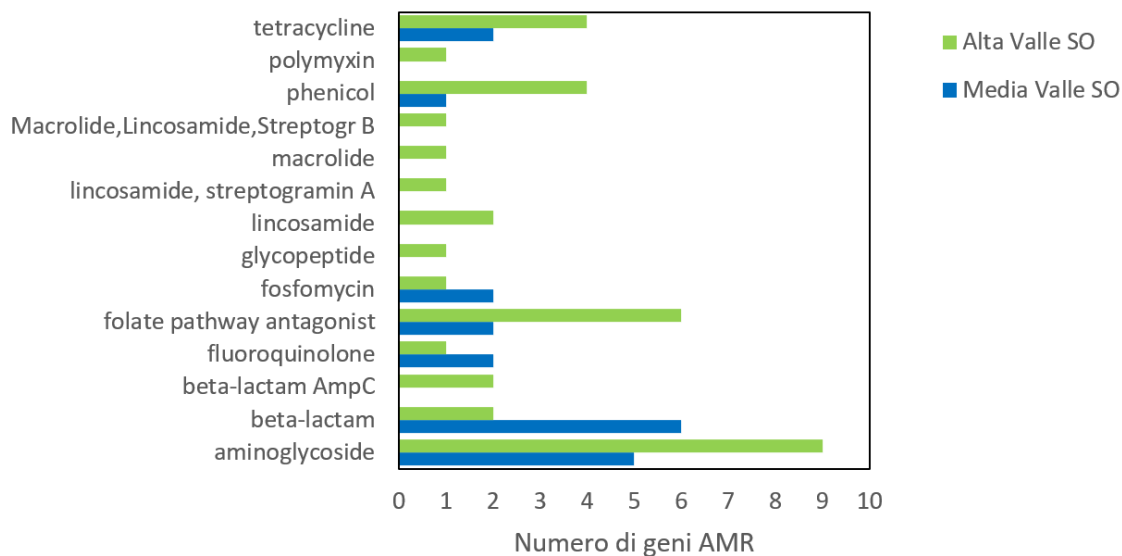
Fig.3: Analisi quantitativa del n. di geni AMR per classi di antibiotici nei pool analizzati

Il test di correlazione per ranghi di Kendall tra la frazione di isolati in ogni pool risultati resistenti a un dato antimicrobico nello screening fenotipico e il numero di geni AMR associati allo stesso antimicrobico trovati nel pool tramite analisi metagenomica è risultato molto significativo ($\tau = 0.65$; $p\text{-value} = 6 \times 10^{-9}$). Tale risultato suggerisce che l'analisi metagenomica shotgun effettuata sui pool abbia risoluzione sufficiente per individuare i geni ARM presenti negli isolati e responsabili dei fenotipi osservati. I pool di *E. coli* (POOL 1-9) mostrano tutti la presenza di geni con resistenze a aminoglycoside, beta-lattamici e tetraciclina. Non sono stati trovati geni AMR appartenenti alle classi: oxazolidinone, steroidi antibatterici e pseudomonas acid. Nel pool di *K. Pneumoniae* (POOL 10) si può notare invece l'elevata presenza di geni legati alla resistenza ai beta-lattamici. Nel POOL 5 è stato individuato anche un gene di resistenza alla colistina della classe *mcr* (*mcr*-9). L'analisi metagenomica ha inoltre permesso di evidenziare differenze

geografiche nel corredo di geni AMR presenti in *E. coli* prelevati in cervidi. In particolare, è stato possibile osservare per tutte le classi fenotipiche un maggior numero di geni AMR negli isolati della provincia di Sondrio rispetto alla provincia di Bergamo.



Anche all'interno dei pool prelevati nelle singole province di Bergamo e Sondrio sembrano emergere pattern differenti di AMR in funzione dell'altitudine di prelievo. In particolare, i pool prelevati da animali che vivono ad altitudini maggiori mostrano generalmente una maggiore presenza di geni AMR in tutte le classi fenotipiche (Figura 5 per Bergamo e Figura 6 per Sondrio).



Discussione

L'analisi metagenomica shotgun mostra una buona corrispondenza con il dato fenotipico (Kendall-tau = 0.65; p-value = $6 \cdot 10^{-9}$). Questo mostra che la metodologia è sufficientemente robusta per individuare con buona confidenza i geni AMR che conferiscono resistenze anche su pool di isolati.

L'analisi dei pool prelevati a diverse altitudini e in diverse province su *E. coli* isolati in cervidi sembrano mostrare un aumento della presenza di geni AMR con l'altitudine. Tale risultato deve essere però confermato attraverso una più completa analisi quantitativa della presenza di reads AMR nei diversi pool.

Bibliografia

Anthony M. Bolger, Marc Lohse, Bjoern Usadel, Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data, *Bioinformatics*, Volume 30, Issue 15, 1 August 2014, Pages 2114–2120,

Bortolaia V, Kaas RS, Ruppe E, Roberts MC, Schwarz S, Cattoir V, Philippon A, Allesoe RL, Rebelo AR, Florensa AF, Fagelhauer L, Chakraborty T, Neumann B, Werner G, Bender JK, Stingl K, Nguyen M, Coppens J, Xavier BB, Malhotra-Kumar S, Westh H, Pinholt M, Anjum MF, Duggett NA, Kempf I, Nykäsenoja S, Olkkola S, Wiczorek K, Amaro A, Clemente L, Mossong J, Losch S, Ragimbeau C, Lund O, Aarestrup FM. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J Antimicrob Chemother.* 2020 Aug 11:dkaa345. doi: 10.1093/jac/dkaa345. Epub ahead of print. PMID: 32780112.